

**DIE POTENTIELLE NEUROPROTEKTIVE FUNKTION PERINEURONALER
NETZE GEGENÜBER TAU-PROTEIN-HYPERPHOSPHORYLIERUNGEN UND
NEUROFIBRILLÄREN TANGLES IN EINEM MAUSMODELL DER
FRONTOTEMPORALEN DEMENZ (P301L)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

(Dr. med.)

an der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht von: Sandra Schmutzler

Geboren am 21.11.1986 in Leipzig

Angefertigt am: Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung,
Abteilung Molekulare und Zelluläre Mechanismen der
Neurodegeneration

Betreuer: Prof. Dr. med. Thomas Arendt

Mitbetreuer: PD Dr. Dr. Markus Morawski

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 29.04.2014

„Wir irren allesamt, nur jeder irret anders“

G.Chr.Lichtenberg

BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG

Schmutzler, Sandra

Die potentielle neuroprotektive Funktion Perineuronaler Netze gegenüber Tau-Protein-Hyperphosphorylierungen und neurofibrillären Tangles in einem Mausmodell der Frontotemporalen Demenz (P301L)

Universität Leipzig, Dissertation

94 Seiten, 158 Literaturangaben, 19 Abbildungen, 37 Tabellen

Referat:

Perineuronale Netze (PN) sind eine spezialisierte Form der neuronalen extrazellulären Matrix. Es wird vermutet, dass sie neuroprotektive Eigenschaften besitzen und die von ihnen umschlossenen Neurone gegenüber Degeneration schützen. Mehrere Studien untersuchten bereits die PN in Zusammenhang mit der Pathologie der Alzheimer-Erkrankung. Für die Frontotemporalen Demenzen, die nach der Alzheimer-Erkrankung und der vaskulären Demenz zu den häufigsten dementiellen Erkrankungen gehören, ist die Beziehung von PN und Tau-Protein (TP)-Pathologie noch nicht untersucht worden.

Die Dissertation beschäftigt sich mit der Korrelation von netztragenden Neuronen mit TP-Pathologie in einem Mausmodell der Frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17). Sie geht der Frage nach, ob netztragende Neuronen vor Degeneration und intrazellulären Ablagerungen von verändertem TP, in Form von Hyperphosphorylierungen (HP) und Neurofibrillären Tangles (NFT), geschützt sind. Mit Hilfe immunhistochemischer Fluoreszenzmarkierung und Western Blot wurden die Gehirne transgener Mäuse mit der P301L-Mutation des TP im Alter von drei und achteinhalb Monaten untersucht. Dabei wurden sechs Hirnregionen ausgewählt: Primärer Somatosensorischer Kortex (PSC), Entorhinaler Kortex (EC), Hippokampus (Hipp), Pars magnocellularis des Nucleus ruber (NR-m), Pars reticulata der Substantia nigra (SN-r) und Motorischer Trigeminskern (Mo5). Die Untersuchungen zeigen, dass die PN bei der FTDP-17 die Neurone nicht explizit vor TP-Pathologie schützen. Jedoch kommt es zu keiner signifikanten Reduktion der netztragenden Zellen im Altersgang, sodass eine neuroprotektive Funktion der PN weiterhin vermutet werden kann.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Perineuronale Netze	1
1.1.1	Aufbau	2
1.1.2	Entwicklung.....	3
1.1.3	Vorkommen und Morphologie	4
1.1.4	Diskutierte Funktionen.....	5
1.1.5	Kurzbeschreibung der untersuchten Hirnregionen und ihrer PN-Vorkommen.....	7
1.2	Tau-Protein	9
1.2.1	Funktion und Aufbau	9
1.2.2	Taupathologie und Tauopathien	10
1.3	Frontotemporale Demenz.....	13
1.3.1	Epidemiologie, Einteilung und Therapie	13
1.3.2	Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17	15
1.3.3	P301L-Mutation.....	16
1.4	Ziel der Arbeit	17
2	MATERIALEN UND METHODEN	18
2.1	P301L-Mäuse	18
2.1.1	Mausmodell P301L.....	18
2.1.2	Präparation des Hirngewebes	20
2.2	Immunhistochemie	21
2.2.1	Fluoreszenzmarkierung	21
2.2.2	Avidin-Biotin-Markierung.....	23
2.2.3	Auswertung am Fluoreszenzmikroskop	24
2.3	Western Blot	25
2.4	Statistische Methoden	29

3	ERGEBNISSE.....	30
3.1	Vorkommen der Perineuronalen Netze in den untersuchten Regionen der P301L- und der Wildtyp-Mäuse	31
3.2	Tau-Protein und Tau-Protein-Veränderungen bei der P301L-Maus.....	32
3.3	Korrelation von Tau-Protein-Veränderungen und Perineuronalen Netzen im Mausmodell.....	36
3.4	Spezielle Betrachtung der untersuchten Hirnregionen	37
3.4.1	Primärer somatosensorischer Kortex.....	37
3.4.2	Entorhinaler Kortex	39
3.4.3	Hippocampus	40
3.4.4	Nucleus ruber, Pars magnocellularis.....	41
3.4.5	Substantia nigra, Pars reticulata.....	43
3.4.6	Motorischer Trigeminskern.....	45
3.5	Nachweis der Spezifität der verwendeten Antikörper am Western Blot.....	46
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	48
4	DISKUSSION.....	50
4.1	Diskussion der Methoden	50
4.1.1	Mausmodell P301L.....	50
4.1.2	Immunhistochemie und deren Auswertung	51
4.1.3	Western Blot.....	52
4.2	Diskussion der Ergebnisse	53
4.2.1	TP-Pathologie der FTDP-17 des Menschen und der P301L-Maus.....	53
4.2.2	Perineuronale Netze und Tau-Protein-Veränderungen	54
4.2.3	Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus auf Chromosom 17 versus Alzheimersche Erkrankung	57
4.2.4	Perineuronale Netze und Neuroprotektion.....	58
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	62

6	LITERATURVERZEICHNIS	64
7	ANHANG	78
7.1	Ausgezählte Absolutwerte je P301L-Maus und Hirnregion	78
7.1.1	Maus P301L 287, 3 Monate.....	79
7.1.2	Maus P301L P301, 3 Monate.....	80
7.1.3	Maus P301L P302, 3 Monate.....	81
7.1.4	Maus P301L P264, 8,5 Monate	82
7.1.5	Maus P301L P265, 8,5 Monate	83
7.1.6	Maus P301L P266, 8,5 Monate	84
7.2	Tabellen mit den errechneten Chancenverhältnissen und Logits je P301L-Maus und Hirnregion	85
7.3	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	86
7.4	Danksagung.....	87

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AD	Alzheimersche Erkrankung
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
AT100	Anti-Phosphotau-100
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserum-Albumin)
Crtl-1	Cartilage link protein 1
CSPG	Chondroitinsulfatproteoglycan
Cy2	Indocarbocyanin 2
Cy3	Indocarbocyanin 3
GABA	γ - Aminobuttersäure
GAG	Glycosaminoglycan
EC	Entorhinaler Kortex
ECM	Extrazellulären Matrix
FTDP-17	Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17
HAG	Humanes Anti-Aggregan
HAPLN	Hyaluronan and proteoglycan binding link proteins
HAS	Hyaluronsynthasen
Hipp	Hippocampus
HP	Hyperphosphorylierung
Mo5	Motorischer Trigeminuskern
mPPP	Maus-Prion-Protein-Promotor
NeuN	Neurales Kernprotein
NFT	Neurofibrilläres Tangle
NFTs	Neurofibrilläre Tangles
NR-m	Nucleus ruber, Pars magnocellularis
OR	Odds ratio
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline-Tween
PFA	Paraformaldehyd
PN	Perineurales Netz/Perineuronale Netze
PSC	Primärer somatosensorischer Kortex
PT205	Phosphotau-205
SN-r	Substantia nigra, Pars reticulata
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TP	Tau-Protein
WFA	Wisteria-floribunda-Agglutinin
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Perineuronale Netze

In den letzten Jahrzehnten ist die Extrazelluläre Matrix (ECM) des Gehirns, mit der Entwicklung der Immunhistochemie, wieder zunehmend in das Zentrum des Interesses wissenschaftlicher Arbeiten gerückt. Sie macht mit etwa einem Fünftel einen erheblichen Teil des menschlichen Hirnvolumens aus (Asher et al. 1995) und scheint zentrale Funktionen in Entwicklung und Homöostase des Nervensystems zu übernehmen.

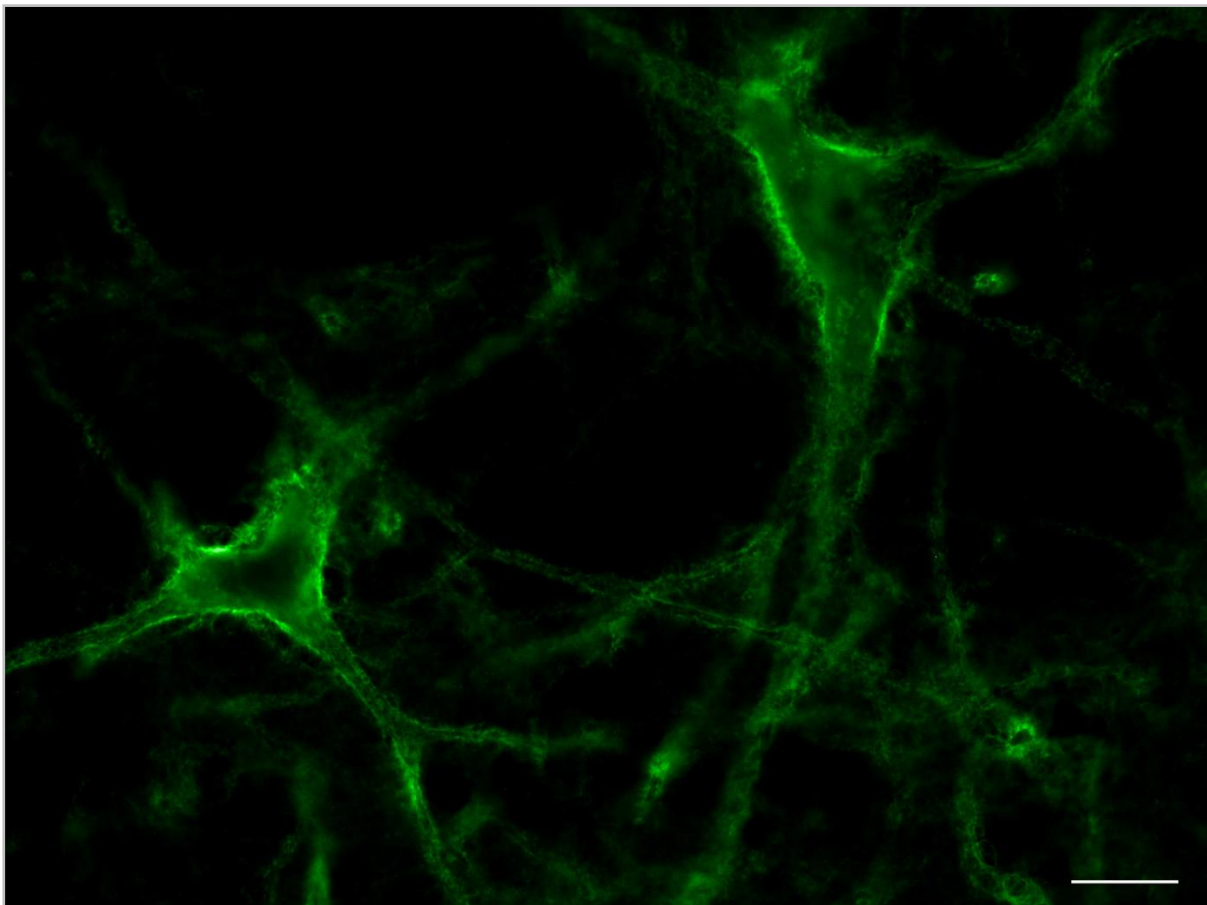


Abb. 1-1 Perineuronale Netze: Aufnahme mit dem Fluoreszenz-Mikroskop nach immunhistochemischer Markierung mit dem Antikörper Humanes Anti-Aggregan (HAG), Maßstab 10µm

1893 wurden die „perizellulären Netze“ erstmals von Camillo Golgi beschrieben (Celio, Blümcke 1994). In den darauf folgenden Jahren beobachteten auch weitere Wissenschaftler bei ihren Untersuchungen Golgis Netze, jedoch waren sie sich uneins über deren Aufbau und Bedeutung im Nervensystem. Während Golgi die Perineuronalen Netze (PN) als die Zelle schützendes und stabilisierendes „Neurokeratin“ interpretierte, glaubte Cajal, die PN seien eine Art Artefakt aus geronnenem Protein (Bignami et al. 1992; Celio, Blümcke 1994; Celio et al. 1998). Aufgrund der begrenzten Genauigkeit der damals angewandten Methoden, wie beispielsweise die Golgi-und

Methylenblau-Färbung, stagnierte die Forschung um die PN vorerst. Mit der Einführung neuer Techniken zur Darstellung einzelner Moleküle im Gewebe wurden die PN erneut entdeckt und werden seit Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts genauer in Zusammensetzung, Struktur, Entwicklung und Funktion untersucht (Brauer et al. 1982, Hockfield, McKay 1983).

1.1.1 Aufbau

Die PN der ECM bestehen aus Hyaluronsäure, Lecticanen, Tenascin-R und Link-Proteinen (Yamaguchi 2000; Brückner et al. 2000; Dityatev, Schachner 2003; Morawski et al. 2012a).

Die Lecticanen Neurocan, Versican, Brevican und Aggrecan gehören zu den Chondroitinsulfat-Proteoglycanen (CSPG). Proteoglycane sind Glycoproteine, an denen Glycosaminoglycane (GAG) kovalent gebunden sind. Diese Glycosaminoglycane sind im Nervensystem vorwiegend Chondroitin- oder Heparansulfat, aber auch Keratansulfat, und bestehen aus 20 bis 200 sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten (Bandtlow, Zimmermann 2000). Während Aggrecan und Versican in vielen weiteren Geweben außerhalb des Zentralen Nervensystems (ZNS) vorkommen, wie beispielsweise in Knorpel und Haut, sind Brevican und Neurocan ausschließlich im neuronalen Gewebe zu finden (Zimmermann et al. 1994; Yamaguchi 1996; Seidenbecher et al. 1995; Schwartz et al. 1996; Yamaguchi 2000; Morawski et al. 2012a).

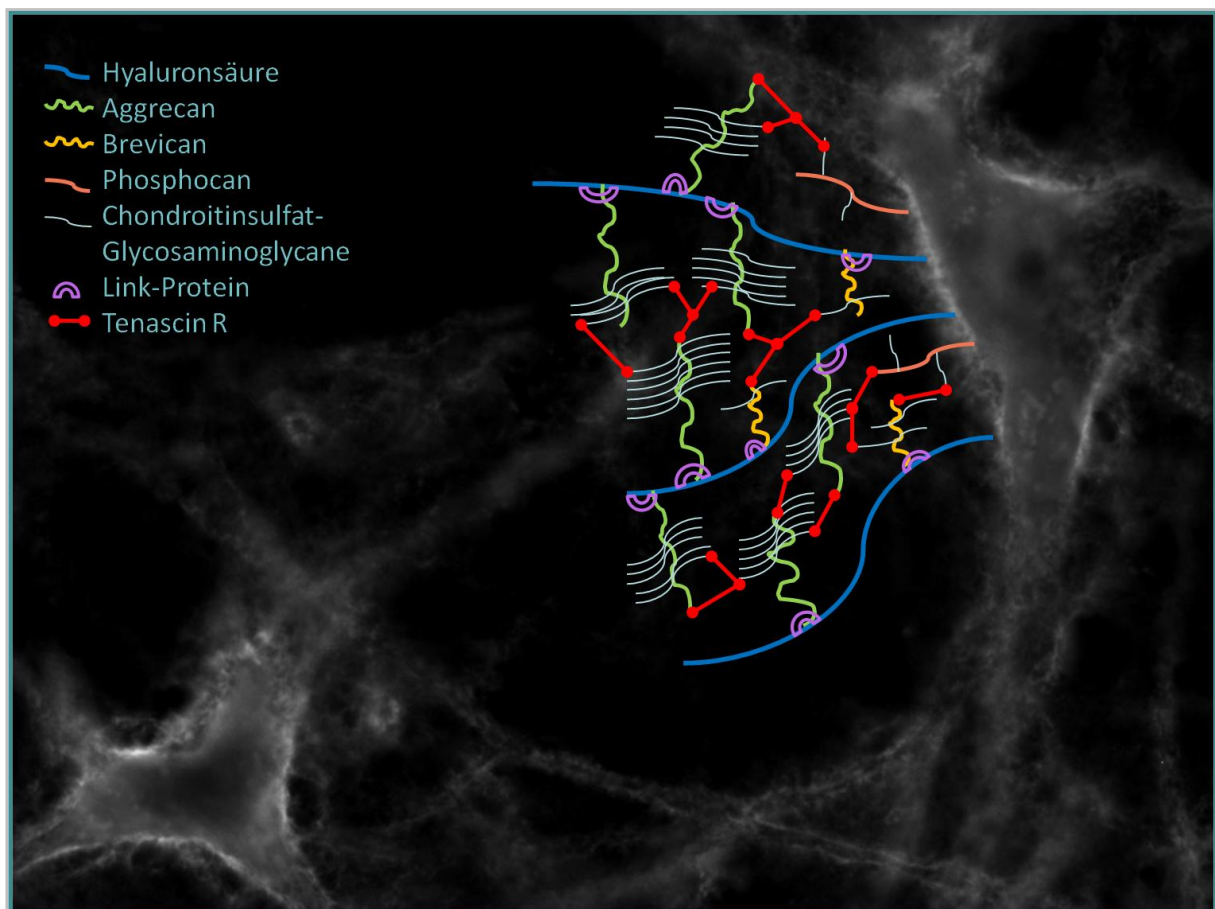


Abb. 1-2 Schematischer Aufbau der Perineuronalen Netze

Die Leticane binden mit ihrem N-Terminus über die Link Proteine HAPLN-1 bis -4 an Hyaluronsäure. Die Gruppe der HAPLNs (hyaluronan and proteoglycan binding link proteins), zu der u.a. Crtl-1 (Cartilage link protein, entspricht dem HAPLN-1) und HAPLN4/Bral2 gehören, ist für Aufbau und Erhalt der Struktur der PN durch die Stabilisierung der Letican-Hyaluronsäure-Bindung wichtig (Kwok et al. 2010; Bekku et al. 2003; Dityatev, Schachner 2003; Zimmermann, Dours-Zimmermann 2008). Hyaluronsäure ist ein proteinfreies Glycosaminoglycan aus Glucosamin und Glucuronsäure, das wesentlicher Bestandteil vieler extrazellulärer Matrices ist. Es wird von den Hyaluronsynthasen (HAS), im ZNS speziell von HAS2 und HAS3, synthetisiert (Carulli et al. 2006; Carulli et al. 2007). Der C-Terminus der Leticane ist vom Lectin-Typ und bindet über eine Protein-Protein-Interaktion an die Fibronektin-Typ-III-Domäne des Tenascin-R (Asperg et al. 1997; Hagihara et al. 1999; Morawski et al. 2012a).

Die Glycoproteinfamilie der Tenascine ist eine weitere wichtige Gruppe der ECM bei Wirbeltieren (Celio et al. 1993; Chiquet-Ehrismann 2004). Es lassen sich vier verschiedene Tenascine unterscheiden: Tenascin-C, -R, -X und -W, wobei das Tenascin-R nur im ZNS zu finden und dort durch den Letican-Hyaluronsäure-Tenascin-R-Komplex in den PN von Bedeutung ist (Hagihara et al. 1999; Yamaguchi 2000; Dityatev, Schachner 2003).

Für die Bindung der PN an die Zelloberfläche netztragender Neuronen scheint, nach Arbeiten der Arbeitsgruppe um James W. Fawcett, die transmembranständige Hyaluronsäure-Synthase oder ein noch nicht identifizierter Hyaluronsäure-Synthase-Rezeptor verantwortlich zu sein (Kwok et al. 2010; Carulli et al. 2006; Galtrey, Fawcett 2007). Auch Giamanco et al. vermuten neben der Hyaluronsäure-abhängigen Bindung eine Befestigung der PN über das Link-Protein an die Neuronen (Giamanco et al. 2010).

1.1.2 Entwicklung

Die Bildung der PN beginnt postnatal, jedoch werden Grundsteine für die Entwicklung bereits pränatal gelegt (Brückner et al. 2000; Carulli et al. 2007; Zimmermann, Dours-Zimmermann 2008). Auch entstehen sie in den verschiedenen Hirnarealen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Brückner et al. beobachteten bei der Untersuchung der postnatalen Entwicklung der PN in Wildtypmäusen einen caudo-rostralen Gradienten in ihrer Reifung. Die PN der subkortikalen Regionen waren tendenziell eher entwickelt als die der kortikalen. So konnten sie beispielsweise im Hirnstamm ab dem vierten Tag postnatal und im zerebralen Kortex ab dem vierzehnten Tag dargestellt werden (Brückner et al. 2000).

Die Bestandteile der PN werden, je nach Molekül, von den Neuronen selbst und/oder von Gliazellen, wie z.B. Astrozyten, gebildet (Asher et al. 1995; Karetko, Skangiel-Kramska 2009). Aggrecan, das den größten Anteil unter den Leticanen ausmacht, wird von Neuronen und vermutlich in Abhängigkeit von deren neuronaler Aktivität gebildet (Matthews et al. 2002;

McRae et al. 2007). Versican wird nur von Gliazellen synthetisiert, Neurocan, Bevicar und Phosphacan sowohl von glialen als auch neuronalen Zellen (zusammenfassend beschrieben in Oohira et al. 2000). Auch Hyaluronsäure und das Link Protein HALPN-1 werden von Neuronen und Gliazellen gebildet (Carulli et al. 2006; Brückner et al. 2008).

Auch wenn bereits vor Auftreten der PN, teilweise schon während der Embryogenese, deren Bestandteile im Extrazellulärraum vorhanden sind, beginnt erst mit der PN-Bildung die Expression von Crt11. Zusätzlich wird die Expression von Aggrecan und HAS hochreguliert. Daraus lässt sich schließen, dass die netzsumhüllten Neurone zunächst von Ansammlungen von Hyaluronsäure und Lecticanen umgeben sind und die Link-Proteine schließlich eine Schlüsselrolle in der Formierung der PN haben könnten (Carulli et al. 2010; Kwok et al. 2010).

Es wird vermutet, dass die Entwicklung der PN stark von der neuronalen Aktivität abhängig ist und exzitatorische glutamaterge Signale in den Neuronen zur Synthese sowie zur Freisetzung von Bestandteilen PN führen (Dityatev et al. 2007; Matthews et al. 2002; McRae et al. 2007).

1.1.3 Vorkommen und Morphologie

Die PN kommen im menschlichen Gehirn in mehr als 100 Regionen verschiedener funktioneller Systeme vor (Seeger et al. 1994). Sie umhüllen die Perikarya, die proximalen Dendriten sowie meist auch die Initialsegmente der Axone von Neuronen netzartig (Brückner et al. 1993; Seeger et al. 1994; Wang, Fawcett 2012), wie z.B. von Interneuronen, Pyramidenzellen und Projektionsneuronen. Sie unterscheiden sich jedoch regional in Häufigkeit, Verteilungsmuster und Morphologie. PN können demnach nicht eindeutig einer bestimmten Gruppe von Neuronen zugeordnet werden.

Häufig handelt es sich im Kortex um schnell feuernde, Parvalbumin- und Kv3.1b-positive, GABAerge Neurone (Härtig et al. 1992; Härtig et al. 1994; Härtig et al. 1999; Brückner et al. 1993; Morris, Henderson 2000; Horn et al. 2003; Zimmermann, Dours-Zimmermann 2008). Jedoch besitzen nicht alle dieser Neurone ein Netz. Kv3.1b ist eine Untereinheit eines spannungsabhängigen Kalium-Kanals, Parvalbumin ein Calcium-bindendes Protein. Beide Komponenten tragen zur Fähigkeit der Zellen bei, durch schnelle Repolarisation eine hohe Rate an Aktionspotentialen zu entwickeln (Härtig et al. 1999; Carulli et al. 2006). Es wird vermutet, dass die PN dabei an der Bereitstellung des für diese schnell feuernden Zellen geeigneten Milieus mitwirken (Brückner et al. 1993; Horn et al. 2003). Auch wurden glutamaterge netzsumhüllte Neurone beschrieben (Wegner et al. 2003). Noradrenerge, dopaminerge und serotonerge Neurone besitzen hingegen keine PN (Hobohm et al. 1998).

Bei der immunhisochemischen Färbung mit Wisteria-floribunda-Agglutinin (WFA), das einen anerkannten und häufig verwendeten Marker für PN darstellt (Härtig et al. 1992) und an das

endständige N-Acetylgalactosamin der GAG-Seitenketten der Leticane der PN bindet, können vier verschiedene PN-Morphologien unterschieden werden: Pyramidenzell-assoziierte PN, Nicht-Pyramidenzell-PN, diffuse PN und die kürzlich erst beschriebenen baumwollartigen PN (Brückner et al. 1999; Wegner et al. 2003; Blosa et al. 2013). Die Pyramidenzell-assoziierten PN zeigen eine immunhistochemisch schwache Markierung (Brückner et al. 1999; Wegner et al. 2003; Morawski et al. 2004) und finden sich vorwiegend in motorischen und sensorischen Hirnregionen. Die Neuronen mit immunhistochemisch gitterartig, scharf konturiert gezeichneten, nicht-pyramidenzell-assoziierten PN wurden noch nicht genauer klassifiziert. Allerdings stellten Brückner et al. fest, dass viele dieser Neuronen GABAerge, Parvalbumin-positive, große Korbzellen sind (Brückner et al. 1999). Die diffusen PN stellen sich mittels WFA mit einer dicken, prominenten Matrix dar. Die PN-tragenden Neurone besitzen große Somata, sind immunoreaktiv für Glutamat sowie den GABA_A-Rezeptor-Antikörper und gehören wahrscheinlich zu den intrakortikalen Projektionsneuronen (Wegner et al. 2003). Die baumwollartigen PN wurden unlängst in den Hellschen Endkelchen des medialen Nucleus corporis trapezoidei der Hörbahn von Blosa et al. beschrieben. Sie unterscheiden sich von den anderen Formen der PN darin, dass sie nur die Somata der Zellen umschließen und nicht die proximalen Anteile der Dendriten (Blosa et al. 2013).

1.1.4 Diskutierte Funktionen

Die Rolle der PN ist bis heute noch nicht sicher geklärt. Jedoch werden drei mögliche Funktionen besonders diskutiert: der Beitrag zur Erhaltung der Ionenhomöostase, zur Stabilität und Plastizität von Synapsen sowie der Schutz der Zellen vor Schädigung (zur Übersicht siehe Morawski et al. 2012a).

Die Vermutung, die PN könnten zum **Ionenhaushalt** der Zellen beitragen, lässt sich durch deren polyanionischen Charakter mit dem hohen Anteil an Hyaluronsäure und stark glykosylierten Chondroitinsulfat-Seitenketten erklären (Brückner et al. 1993). Die negative Ladung führt vermutlich zum Austausch von Kationen und verhindert so die freie Diffusion von positiv geladenen Kalium-, Calcium- und Natrium-Ionen (Härtig et al. 1999). So zeigten auch Hrabtova et al., dass es die Spaltung der CSPG mit Hilfe des Enzyms Chondroitinase ABC den Diffusionsquotienten von Calcium erhöht und CSPG folglich die Diffusionseigenschaften von Calcium im Hirngewebe beeinflussen (Hrabtova et al. 2009).

Die Proteoglycane der ECM des ZNS spielen wahrscheinlich eine große Rolle in der neuronalen Entwicklung. So tragen sie zu Neurogenese, Zellmigration, axonaler Aussprossung und zur **synaptischen Plastizität** bei (Bandtlow, Zimmermann 2000, zusammenfassend beschrieben in Wang, Fawcett, 2012). Auch die CSPG der PN sollen neben der Stabilisierung auch die Bildung neuer Synapsen verhindern und folglich die **neuronale Plastizität** limitieren (Hockfield et al.

1990; Bukalo et al. 2001; Pizzorusso et al. 2002; Dityatev et al. 2007). Beispielsweise beobachteten Carulli et al., dass die Triggerung der Bildung von PN, durch erhöhte Produktion des Link-Proteins, die Plastizität im visuellen Kortex und Nucleus Caudatus beschränkt. Foscarin et al. bekräftigten dies, indem sie zeigten, dass eine erhöhte Exposition bestimmter Umweltreize zu einer deutlichen Reduktion von PN und somit zur Möglichkeit der Knüpfung neuer synaptischer Kontakte führt (Foscarin et al. 2011). Aufgrund dieses Sachverhaltes beschäftigen sich etliche Forschungsgruppen mit der zeitweiligen Wiederherstellung neuronaler Plastizität durch den gezielten Abbau von Chondroitin-Sulfat-Proteoglycanen um eine strukturelle und funktionelle Wiederherstellung nach Schädigungen des zentralen und peripheren Nervensystems zu ermöglichen (Moon et al. 2001; Bradbury et al. 2002; Barritt et al. 2006; Massey et al. 2006; Wang et al. 2011; Garcia-Alias et al. 2011; Soleman et al. 2012).

Auf die möglichen **neuroprotektiven Eigenschaften** der PN verwies 1911 erstmalig Carlo Besta. Er beobachtete die Reaktion der PN auf induzierte akute und chronische neuronale Schädigung und stellte fest, dass diese dabei intakt blieben (Celio et al. 1998). Neuere Arbeiten unterstützen die inzwischen einhundert Jahre alten Beobachtungen des italienischen Neurologen. Mehrfach wurde eine Resistenz der PN gegenüber verschiedener schädigender Noxen nachgewiesen: Beispielsweise wurde in Ratten, die mit Trimethyltin behandelt wurden, der Untergang von nicht-netztragenden Pyramidenzellen im Hippocampus beobachtet, während die benachbarten netztragenden Interneuronen bestehen blieben (Schüppel et al. 2002). Mit β -Amyloid versetzte neuronale Zellkulturen führten nicht zum Verlust netztragender Neurone, jedoch zum Untergang der Zellen ohne PN (Miyata et al. 2007). Bei Schädigung durch Eisen(III)-Chlorid degenerierten signifikant weniger Zellen mit PN als nicht-netztragende Zellen (Suttkus et al. 2012). Außerdem weisen PN und PN-reiche kortikale Hirnregionen beim Menschen weniger Lipofuszin-Ansammlungen auf, das im Vergleich zu PN-armen Regionen auf verminderten oxidativen Stress hindeutet (Morawski et al. 2004).

Seit einigen Jahren werden die Netze besonders bei der Alzheimerschen Erkrankung (AD) untersucht (Brückner et al. 1999; Morawski et al. 2010b; Morawski et al. 2010a; Morawski et al. 2012b; Lendvai et al. 2013). Die AD ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, die durch eine ausgeprägte parietotemporale Hirnatrophie mit Beeinträchtigung u.a. kognitiver Funktionen, wie Gedächtnis, Orientierung, und Konzentration charakterisiert ist. Histopathologische Kennzeichen der 1906 erstmals von Alois Alzheimer beschriebenen Krankheit sind ausgeprägte Verluste von Neuronen in Hippocampus und Nucleus basalis Meynert, die Bildung extrazellulärer seniler Plaques aus β -Amyloid-Ablagerungen sowie die Bildung intrazellulärer Neurofibrillärer Tangles (NFT) durch Aggregation des Tau-Proteins (Müller et al. 2011; Arendt 2001). Bei Untersuchungen der PN wurde kein Unterschied in der Dichte der ECM und der PN zwischen Patienten mit AD und Kontrollpatienten festgestellt. Das

heißt, dass die PN und die von ihnen umhüllten Neurone wahrscheinlich nicht durch die Erkrankung beschädigt werden. Des Weiteren wurde kaum Alzheimer-Pathologie in den von PN umgebenen Zellen, sowohl kortikal als auch subkortikal, entdeckt (Brückner et al. 1999; Morawski et al. 2010b; Morawski et al. 2010a; Morawski et al. 2012b).

Ohne, dass bisher die genauen Mechanismen bekannt sind, weisen die Ergebnisse dieser Studien auf eine neuroprotektive Funktion der PN hin. Die Schutzmechanismen der PN sowie deren Rolle in anderen neurodegenerativen Erkrankungen gilt es weiterhin zu untersuchen.

1.1.5 Kurzbeschreibung der untersuchten Hirnregionen und ihrer PN-Vorkommen

Es erfolgt nun eine kurze Beschreibung der in dieser Arbeit untersuchten Hirnregionen, hinsichtlich deren anatomisch-neurologischen Einordnung. Da die Verteilung der PN häufiger beim Gehirn von Nagetieren als beim Menschen untersucht wurde, werden die Angaben über PN-Vorkommen Forschungsarbeiten entnommen, die sich der „Kartierung“ am Nagergehirn widmeten.

Primärer somatosensorischer Kortex (PSC): Der PSC umfasst im menschlichen Gehirn die Brodmann-Areale 1, 2 und 3. Er ist somatotopisch gegliedert und verarbeitet die somatosensiblen Impulse der Haut sowie der Propriozeption von Muskelspindeln, Sehnen- und Gelenkrezeptoren der kontralateralen Körperhälfte (Trepel 2004). In den somatosensorischen Gebieten der Nagetiere sind etwa 10% der Neuronen von einem PN umgeben. Bei diesen Neuronen handelt es sich um Pyramidenzellen und Interneurone. Sie sind vorwiegend in der Schicht IV, im unteren Teil der Schicht V und im oberen Teil der Schicht VI zu finden (Bertolotto et al. 1996; Köppe et al. 1997; Alpár et al. 2006).

Entorhinaler Kortex (EC): Der Entorhinale Kortex (entspricht der Brodmann-Area 28 beim Menschen), im medialen Temporallappen lokalisiert, ist eine wichtige Nahtstelle zwischen Hippocampus und Neokortex. Er wird zur Hippocampusformation (bestehend aus Hippocampus, Gyrus parahippocampalis und entorhinalem Kortex) und somit auch zum Limbischen System gezählt. Aus ihm entspringt der Tractus perforans, der Afferenzen aus vielen Hirnregionen zum Hippocampus leitet (Schünke et al. 2009). Die Neuronen der Regio entorhinalis im Gehirn der Nager, überwiegend Pyramidenzellen sowie GABAerge Interneurone, besitzen nur sehr wenige PN (etwa 2-5%) (Seeger et al. 1994; Bertolotto, Manzardo, Guglielmone 1996; Köppe et al. 1997; Lendvai et al. 2013).

Hippocampus (Hipp): Der größte Teil des Hippocampus des Menschen befindet sich im Temporalappen, medial des Unterhorns des Seitenventrikels. Er setzt sich in die Fornix fort, die wiederum in den Corpora mamillaria endet (Papez-Neuronenkreis). Im Gegensatz zum Neokortex besteht der Hippocampus nur aus drei Rindenschichten und wird in drei Gebiete

unterteilt: Gyrus dentatus (Fascia dentata), Cornu ammonis (Ammonshorn) und Subiculum (Trepel 2004; Schünke et al. 2009). In den Feldern CA1 bis CA3 des Ammonshorns des Nagers des Hippocampus sind viele PN zu finden. Auch im Gyrus dentatus werden moderate Anteile PN-tragender Neuronen beschrieben (Seeger et al. 1994; Lendvai et al. 2013).

Nucleus Ruber, Pars magnocellularis (NR-m): In dieser Arbeit wurde der Pars magnocellularis des NR untersucht. Dieser runde, rötliche Kern, dessen Färbung durch den hohen Eisengehalt in den Perikarya zu erklären ist, befindet sich in der Mitte des Tegmentums im humanen Mittelhirn. Er ist Teil des extrapyramidalen motorischen Systems. Histologisch wird der Nucleus ruber in die Pars magnocellularis und die Pars parvocellularis unterschieden (Trepel 2004). Im Nagergehirn wird der überwiegende Anteil der Neuronen von PN umschlossen (Seeger et al. 1994). Laut Bertolotto et al. machen netztragende Neurone einen Anteil von 41-58% der gesamten Neuronenpopulation aller motorischen Kerne aus (mit Ausnahme der preganglionären parasympathischen Kerne), so also auch in Substantia nigra und Nucleus motorius nervi trigemini. Speziell im Ncl. Ruber sind es ca. 50% (Bertolotto et al. 1996).

Substantia nigra, Pars reticulata (SN-r): Die Substantia nigra liegt zwischen den Crura cerebri und dem Tegmentum im Mittelhirn. Auch die Pars reticulata der Substantia nigra zählt zum extrapyramidalen System (Trepel 2004). In dieser Region umhüllen die PN GABAerge Projektionsneurone. Die dopaminergen Zellen der Pars compacta hingegen besitzen keine Netze (Hobohm et al. 1998). Insgesamt machen die PN einen Anteil von etwa 40% der gesamten Neuronenpopulation der SN-r des Rattengehirns aus (Bertolotto et al. 1996).

Motorischer Trigeminkern (Mo5): Dieses kleine Kerngebiet befindet sich in der Pons. Seine Fasern innervieren durch den Nervus mandibularis u.a. die Kau- und Mundbodenmuskulatur (Schünke et al. 2009). Auch hier wurden bereits sehr hohe PN-Vorkommen im Gehirn des Nagetiers beschrieben (Seeger et al. 1994).

1.2 Tau-Protein

1.2.1 Funktion und Aufbau

Das Protein Tau (TP) wurde 1975 erstmals beschrieben und bekam seinen Namen durch seine Assoziation zu Tubulin (Tubulin associated unit) (Weingarten et al. 1975). Seine Funktion besteht vor allem in der Ausbildung und Stabilisierung der Mikrotubuli (Weingarten et al. 1975; Witman et al. 1976; Cleveland et al. 1977). Folglich ist es wichtig für den Erhalt der Zellmorphologie sowie für den axonalen Transport von Zellorganellen und Vesikeln, z.T. über weite Distanzen. Auch ist das TP für die Bildung, Reifung und Länge der dendritischen Dornfortsätze verantwortlich (Kremer et al. 2011). Da es mit Aktin interagiert spielt es wahrscheinlich auch eine Rolle in der Regulation der Mikrofilamente des Zytoskeletts (Zusammenfassende Beschreibung der Funktionen des Proteins in den Reviews Liu, Gong 2008; Spires-Jones et al. 2009; Morris et al. 2011). Der axonale Transport in Neuronen ist jedoch wahrscheinlich nicht ausschließlich vom TP abhängig. Yuan et al. zeigten, dass der axonale Transport weder in Tau-Knockout-Mäusen, noch in Mäusen, die das Protein überexprimieren, wesentlich beeinträchtigt ist (Yuan et al. 2008).

Das TP des Menschen wird von einem einzigen Gen auf Chromosom 17 exprimiert. Dieses Gen besitzt 16 Exons, von denen die Exons 4a, 6 und 8 nur im TP des peripheren Nervensystems vorkommen (Andreadis et al. 1992). Im ZNS werden 6 Tau-Isoformen exprimiert. Die Exons 2, 3 und 10 unterliegen dem alternativen Splicing. Exon 2 und 3 kodieren für 29 oder 58 Aminosäure-Insertionen am N-Terminus. Exon 3 kommt nie allein, sondern nur gemeinsam mit Exon 2 vor (Andreadis et al. 1992; Andreadis et al. 1995). So ergeben sich für das N-terminale Ende folgende Möglichkeiten: 0N (ohne die Exons 2 und 3), 1N (durch Exon 2) und 2N (durch Exon 2 und 3).

Das Exon 10 ist für das Vorhandensein einer zusätzlichen Wiederholung der 18 Aminosäure-langen Mikrotubuli-Bindungsregion am C-Terminus, und somit für die Bildung von 4-Repeat-TP (4R-TP), verantwortlich. Ist das Exon 10 herausgespliced, so wird 3R-TP gebildet (Lee et al. 1989; Tolnay, Probst 2003; Liu, Gong 2008).

Durch das alternative Splicing der Exone 2, 3 und 10 ergeben sich somit folgende möglich 6 Isoformen: 0N/4R, 1N/4R, 2N/4R, 0N/3R, 1N/3R und 2N/3R (siehe Abb. 1-3).

Da das 4R-Tau eine Tubulin-Bindungsdomäne mehr besitzt als 3R-TP, weist es auch eine höhere Bindungsaffinität zu Tubulin in den Mikrotubuli auf (Lee et al. 1989). Goedert et al. konnten 1990 zeigen, dass 4R-TP im Vergleich zu 3R-Tau den Aufbau von Mikrotubuli 2,5 bis 3 Mal schneller unterstützt, unabhängig von der Beschaffenheit des N-terminalen Endes (Goedert, Jakes 1990). Während der Entwicklung des Nervensystems verändert sich das Verhältnis von

3R- und 4R-TP. Während im fetalen Hirn fast ausschließlich 3R-TP zu finden ist, ist die Menge an 3R- und 4R-TP im erwachsenen menschlichen Gehirn etwa gleich (Goedert et al. 1989).

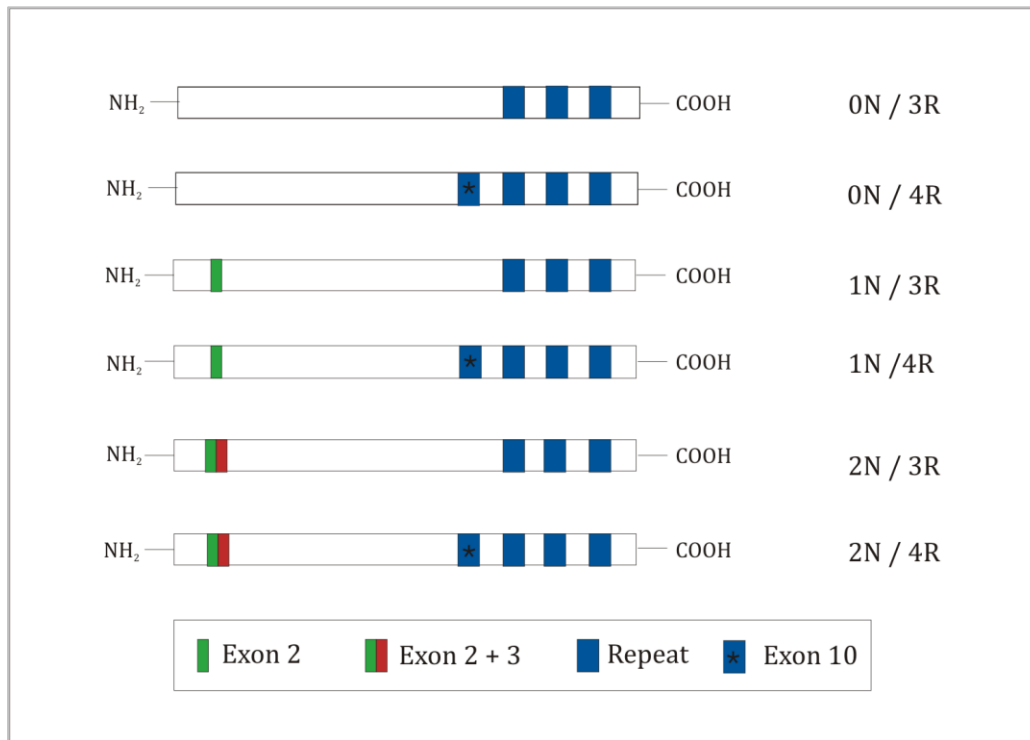


Abb. 1-3 Schematische Zeichnung der 6 Isoformen des Tau-Proteins mit den alternativen Exons 2, 3 und 10, ohne Berücksichtigung der individuellen Längenunterschiede der Isoformen (modifiziert nach Spillantini, Goedert 1998)

Jedoch bestimmt nicht nur die Anzahl der Bindungsdomänen am C-Terminus des Proteins die Affinität zu Tubulin. Auch posttranslationale Modifikationen tragen zur Bindung an die Mikrotubuli bei. Dazu gehören u.a. die Glycosylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und Nitrierung. Dabei macht die Phosphorylierung den Hauptteil der posttranslationalen Modifikation aus, bei der vor allem die Aminosäuren Serin und Threonin, aber zu einem kleinen Teil auch Tyrosin, durch Anhängen einer Phosphatgruppe verestert werden (Martin et al. 2011). Phosphorylierung vermindert die Affinität des TP zu Mikrotubuli und wird durch Kinasen katalysiert, die Dephosphorylierung wiederum von Phosphatasen. Ein Gleichgewicht zwischen beiden Enzymen ist folglich für die Aufrechterhaltung der Funktionen des Proteins unerlässlich.

1.2.2 Taupathologie und Tauopathien

Charakteristisch für die Pathogenese vieler neurodegenerativer Erkrankungen sind Ablagerungen morphologisch veränderter Proteine (Zusammenfassend beschrieben im Review von Goedert, Spillantini 2011). So spielen auch Veränderungen des TP in der Pathogenese einiger degenerativer Erkrankungen des ZNS eine wesentliche Rolle. Zu diesen Tauopathien, die durch intrazelluläre Aggregate des Proteins charakterisiert sind, gehören z.B. die Alzheimersche Erkrankung sowie verschiedene Formen der Frontotemporalen Demenz (Morbus Pick,

Kortikobasale Degeneration, Progressive supranukleäre Blickparese und Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17)).

Eine interessante Überlegung zur Pathogenese beschreiben Kremer et al, die hinter den Mutationen des TP einen „Versuch“ der Evolution vermuten, die Bildung und Reifung neuer synaptischer Kontakte und somit die kognitiven Fähigkeiten zu verbessern. Die darauffolgende, mit dem Alter fortschreitende Tauopathie und der kognitive Untergang vermeiden offenbar den festen Einbau der Mutation in das TP-Gen in der Population (Kremer et al. 2011).

Die genauen Pathomechanismen der Tauopathien sind bis heute nicht geklärt. In allen Tauopathien werden Hyperphosphorylierungen sowie Aggregationen des TP beobachtet (Buée, Delacourte 1999; Spillantini et al. 2000; Tolnay, Probst 2003; Spires-Jones et al. 2009; Goedert, Spillantini 2011). Die intrazelluläre Aggregation des TP verläuft vermutlich in mehreren Stadien: Zu Beginn erfolgt die Phosphorylierung, die die Ablösung von den Mikrotubuli und die Ansammlung des Proteins in somatodentritischen Kompartimenten zur Folge hat. Weitere potentiell reversible Phosphorylierungen (Hyperphosphorylierung) und die Bildung von Fibrillen („Paired Helical Filaments“, PHF) schließen sich an, die letztlich irreversibel zu sogenannten Neurofibrillären Tangles (NFT) sowie zu „Neuropil threads“ in Axonen und Dendriten aggregieren (Gomez-Isla et al. 1997; Spires-Jones et al. 2009; Martin et al. 2011; Goedert, Spillantini 2011).

Derzeit werden deshalb zwei offene Fragen besonders intensiv diskutiert: Welche Ursache haben die vermehrten Ablagerungen von hyperphosphorylierten TP? Welcher Mechanismus führt letztlich zum Untergang der Neuronen?

Zur verstärkten Phosphorylierung des Proteins kann ein Ungleichgewicht von Kinasen und Phosphatasen führen (Ballatore et al. 2007). Auch sind Verschiebungen des Verhältnisses von R3-TP und R4-TP in den jeweiligen Tauopathien bekannt, die auf verändertes alternatives Splicing während der Erkrankungen hinweisen (Hutton et al. 1998; Spires-Jones et al. 2009). Vermutlich besitzen die Mikrotubuli nur eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen für 4R-bzw. 3R-TP. Der daraus resultierende Überschuss an 4R-oder 3R-TP könnte folglich für die erhöhte Konzentration an ungebundenem TP im Zytoplasma der Neuronen verantwortlich sein (Hutton, Hutton 2001).

Auch ist noch unklar, ob die gestörte Bindung an die Mikrotubuli zu deren Insuffizienz und schließlich zum Zelltod führt, oder ob dieser durch toxische Wirkungen der Ansammlungen an ungebundenem, hyperphosphorylierten TP im Zytoplasma hervorgerufen wird (Alonso et al. 2006; Sydow et al. 2011). Da Phosphorylierungen zu einer geringeren Affinität des Proteins zu den Mikrotubuli und somit zu deren Ablösung führen, entsteht ein gestörtes Gleichgewicht von ungebundenem und an Mikrotubuli-gebundenem TP. Folgen können die Destabilisierung mit

Funktionseinschränkungen des Mikrotubuliapparates sowie eine gestörte Interaktion mit Aktin und Veränderungen des Cytoskeletts sein. Diese Funktionseinschränkungen können sich beispielsweise in Störungen des axonalen Transportes mit Verlust von Synapsen äußern (Spire-Jones et al. 2009; Martin et al. 2011).

Es gibt verschiedene Hypothesen darüber, welches der Stadien der erhöhten TP-Phosphorylierungen (Hyperphosphorylierung, Fibrillenbildung oder NFT-Formierung) für den Untergang der Neuronen verantwortlich ist. Del C. Alonso et al. vermuten beispielsweise, dass die Hyperphosphorylierung des TP bereits schädlich ist und die Bildung von Fibrillen eine Art Schutzmechanismus vor weiteren Schäden der Zelle darstellt (Alonso et al. 2006). Allerdings ist auch ein physiologisches Auftreten von stark phosphoryliertem, PHF-ähnlichem TP in Säugetieren während des Winterschlafs bekannt (Stieler et al. 2011).

Da mit der Progression der Erkrankung auch die Zahl der NFT zunimmt, wird eine toxische Eigenschaft der NFT vermutet. Diese könnte im Verlust der Funktionen des TP, aber auch in der Größe der NFT begründet sein, durch die es zur Zerstörung der zellulären Funktionen und des axonalen Transport kommen könnte (Ballatore et al. 2007). Allerdings wurde die Theorie, dass die NFTs für die Progression der Erkrankung eine wesentliche Rolle spielen, in Frage gestellt: In einem Mausmodell konnten die kognitiven Funktionen durch Unterdrückung des transgenen TP wieder hergestellt und der Neuronenuntergang aufgehalten werden. Allerdings schritt die Bildung der NFT voran (Santa Cruz et al. 2005). So sind bis heute noch viele Fragen die TP-Pathologie betreffend ungeklärt.

1.3 Frontotemporale Demenz

Die Bezeichnung „Frontotemporale Demenz“ umfasst eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen die durch Atrophie von Frontal- und/oder Temporallappen des Hirngewebes charakterisiert sind und mit Veränderungen in (Sozial-)Verhalten, Persönlichkeit und Sprache einhergehen. Arnold Pick, Neurologe und Psychiater Ende des 19. Jahrhunderts, war bestrebt „Neuropathologie und Psychiatrie in immer engeren Connex zu setzen und dadurch die letztere dem medicinischen Verständnisse näher zu bringen“ (Pick 1892, S.165). Er beschrieb 1892 erstmals einen 71-jährigen Patienten, der durch zunehmende Verhaltensauffälligkeiten, „progressiver Gedächtnisschwäche“ sowie einer ausgeprägten Aphasie auffiel („Verlust des Verständnisses der Sprache und Schrift, Paraphasie und teilweise erhaltenes Nachsprechen“). Die pathologische Untersuchung jenes Patienten zeigte eine Atrophie besonders des linken Lobus temporalis.

1.3.1 Epidemiologie, Einteilung und Therapie

Nach der Alzheimerschen Erkrankung und der Lewy-Körper-Demenz ist die Frontotemporale Demenz die dritthäufigste Ursache kortikaler Demenzen (Neary et al. 1998). Die FTD beginnt vorwiegend im präsenilen Alter, im Mittel im fünften Lebensjahrzehnt, wobei die Spannweite sehr groß ist und von den Zwanzigern bis weit in die siebziger Lebensjahre hinein reicht (Neary et al. 1998; Kumar-Singh, van Broeckhoven 2007; Rosso et al. 2003; Ratnavalli et al. 2002).

In der Region Zuid-Holland in den Niederlanden werden Prävalenzen von 3.6 pro 100.000 im Alter von 50 bis 59 Jahren, 9.4 pro 100 000 im Alter von 60 bis 69 Jahren und 3.8 pro 100 000 in der Altersgruppe von 70 bis 79 Jahren beschrieben (Rosso et al. 2003). Eine Studie aus Cambridge, Großbritannien, gibt eine Prävalenz der FTD von 15/ 100.000 im Alter von 45 bis 64 Jahren an (Ratnavalli et al. 2002). Die Inzidenz in der Region in und um Cambridge wird auf 3,5 Personen je 100.000 im Jahr geschätzt (Mercy L. et al. 2008). Etwa 40% der Patienten haben eine positive Familienanamnese (Josephs 2007).

Die Krankheitsbilder und Ausprägungen der Frontotemporalen Demenzen (FTD) sind sehr heterogen und variieren nicht nur zwischen, sondern auch innerhalb der verschiedenen Subtypen. Jedoch haben alle Patienten mit FTD, wie auch bei allen anderen neurodegenerativen Demenzerkrankungen, eine verminderte Lebenserwartung und sind v.a. im terminalen Stadium der Erkrankung pflegebedürftig.

Klinisch werden die Frontotemporalen Demenzen in 3 Haupttypen unterteilt (Neary et al. 1998):

- Frontale/frontotemporale Verlaufsform mit führender Wesensänderung

- Primär-progressive Aphasie (führende nichtflüssige Aphasie, primär nur geringe Verhaltensänderungen, im Spätstadium jedoch ausgeprägt)
- Semantische Demenz (führende flüssige, semantische Aphasie, mit Wesensveränderungen, jedoch weniger deutlich ausgeprägt als in der frontalen Verlaufsform).

Histopathologisch können die FTD in Tauopathien und Nicht-Tauopathien eingeteilt werden. Mehr als 50% machen dabei die Nicht-Tauopathien aus. Zu diesen gehören die FTD mit Ubiquitin-positiven neuronalen Einschlüssen, die Motorneuronen-Erkrankung (mit oder ohne Mutationen im Progranulin-Gen) und die FTD mit mangelnder charakteristischer Histopathologie (dementia lacking distinctive histopathology-DLDH) (Jellinger 2008; Kumar-Singh, van Broeckhoven 2007).

Zu der FTD mit Tau- Aggregationen zählen die Pick-Erkrankung, die Korticobasale Degeneration, die Progressive supranukleäre Paralyse und die Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17).

Diese Tauopathien der FTD lassen nochmals eine Unterteilung hinsichtlich des Tau-Typs zu, der in den Erkrankungen verändert und beeinträchtigt ist. So sind in der Pick-Erkrankung Ablagerungen mit überwiegend 3-Repeat-Tau zu beobachten. Die der Korticobasalen Degeneration und der Progressiven supranukleären Paralyse sind durch 4R-Tau dominiert, während die Ablagerungen der FTDP-17 sowohl 3R-als auch 4R-Tau in unterschiedlichen Konzentrationen aufweisen (Jellinger 2008; Kumar-Singh, van Broeckhoven 2007).

Für Patienten mit FTD bestehen derzeit noch keine Therapiemöglichkeiten zur Heilung oder Verhinderung der Progression der Erkrankung. Ebenso existiert keine spezifische Pharmakotherapie zur Behandlung der FTD. Laut der S3-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) kann aufgrund fehlender Evidenz keine pharmakologische Therapie empfohlen werden (AWMF 2009). Jedoch wird in der Fachliteratur der Einsatz von Selektiven-Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern (SSRIs) und Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmern (SNRIs) zur symptomatischen Therapie der Verhaltenssymptome (wie Depression, Enthemmung, Zwangsverhalten) berichtet und empfohlen (Graff-Radford, Woodruff 2007; Rabinovici, Miller 2010), da bei FTD Veränderungen des serotoninerger Transmittersystems bekannt sind, sowohl prä- als auch postsynaptisch (Huey et al. 2006). Die Kombination von Levodopa und Carbidopa wird bei Patienten mit Parkinsonismus eingesetzt (Rabinovici, Miller 2010).

Die nichtmedikamentöse Therapie basiert auf psychosozialen Interventionen bestehend aus Physiotherapie, Ergotherapie, kognitivem Training, künstlerischen Therapien (Musik-, Kunst-, Tanztherapien), multisensorische Verfahren, Realitätsorientierung und Reminiszenzverfahren.

Nicht zu vergessen ist die Edukation der Familienangehörigen mit Aufklärung über Strategien zur Bewältigung und Entlastung (AWMF 2009).

Derzeit beschäftigen sich Forschungsgruppen mit der Möglichkeit einer aktiven Immunisierung gegen pathologisches Tau-Protein. Erste Versuche am Tiermodell konnten Erfolge in der Verlangsamung der Progression der NFT-Ausbildung zeigen (Bi et al. 2011).

1.3.2 Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17

Die Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17) ist eine Form der Frontotemporalen Demenz mit Tauopathie. Da dieser Erkrankung Mutationen des Tau-Protein-Gens zugrunde liegen (Locus: 17q21-22) (Wilhelmsen et al. 1994), wird sie in der Literatur auch häufig als FTD mit Mutation des Mikrotubuli-assoziiertem Protein-Tau-Gens (MAPT-Gen) bezeichnet.

Auch innerhalb dieser Erkrankung sind Genetik, Neuropathologie und die klinische Symptomatik sehr heterogen. Sie wird autosomal-dominant vererbt. Derzeit sind 44 verschiedene MAPT-Mutationen im Chromosom 17 bekannt (Goedert, Spillantini 2011), beispielsweise Missense-Mutationen im Exon 10 (P301L, P301S), Exon-10-Splice-Mutationen (N279K, L284L, E10 5'+6) und Missense-Mutationen außerhalb des Exons 10 (G272V, V337M, R406W) (Neary et al. 1998; Hutton 2000).

Gemein ist all jenen Mutationen, dass sie pathologische TP-Ablagerungen in Neuronen und Gliazellen zur Folge haben. Die FTDP-17 führt zu einer Atrophie im frontotemporalen Hirnbereich mit Untergang von Neuronen, Proliferation von Gliazellen sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz und zur Spongiosis in den oberen Schichten der grauen Substanz. In einigen Fällen tritt auch eine Atrophie der Basalganglien sowie Pigmentverlust der Substantia nigra auf (Hutton 2000; Cairns et al. 2007).

Laut einer Untersuchung von Cairns et al, die sich mit der neuropathologischen Diagnostik und nosologischen Kriterien für die Frontotemporale Demenz beschäftigten, korrelieren die pathologischen Ablagerungen in ihrer Dichte und Verteilung nicht zwingend mit der klinischen Symptomatik. Koedam et al. untersuchten die Charakteristika der FTD in der Bildgebung durch die Magnetresonanztomographie (MRT) und konnten auch da keine Korrelation zwischen klinischem Phänotyp und Ausprägung einer Lobaratrophie feststellen (Koedam et al. 2010). Genauso wenig lassen sich anhand des klinischen Phänotyps Rückschlüsse auf den Genotyp, also die Art der Tau-Mutation, zu (Spillantini et al. 2000).

Die Erkrankung beginnt in der Regel zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr. Veränderungen der Persönlichkeit und des Sozialverhaltens äußern sich v.a. in Enthemmung und Apathie. Auch werden häufig ein gestörtes Urteilsvermögen, physische und verbale Aggressivität, Psychosen,

zwanghaftes Verhalten, Alkoholismus und Vernachlässigung der körperlichen Pflege beschrieben. In späterem Krankheitsstadium fallen die Patienten durch zunehmende kognitive Defizite und in einigen Fällen auch durch eine extrapyramidale Symptomatik in Form von Parkinsonismus auf (Spillantini et al. 2000; D'Souza et al. 2005; Kumar-Singh, van Broeckhoven 2007; Graff-Radford, Woodruff 2007).

1.3.3 P301L-Mutation

Die P301L-Mutation ist eine Missensemutation in der Mikrotubuli-Bindungsdomäne des Tauproteins. Sie liegt auf dem Exon 10, in der zweiten Mikrotubuli-Bindungsdomäne und verursacht einen Aminosäurenwechsel. Die 301-ste Aminosäure des TP, Prolin, wird durch Leucin ersetzt. Da dieses Exon 10 bei 3R-Tau herausgespliced wird, betrifft diese Mutation das 4R-Tau (Hutton et al. 1998; Bird et al. 1999). Es entsteht ein Ungleichgewicht im Verhältnis zwischen beiden Isoformen zugunsten der 4R-Isoform. Dies führt zu einer starken Beeinträchtigung der Funktion des Taus in der Bindung und Polymerisation der Mikrotubuli mit Förderung des Aufbaus dergleichen (Hasegawa et al. 1998). Histopathologisch sind TP-positive Ablagerungen in Nerven- und Gliazellen in Frontal- und Temporalhirn, in der Substantia nigra und im Hippocampus zu beobachten. In den Nervenzellen ordnen sich diese kleinen, runden „TP-Körper“ um den Nucleus herum an. Auch werden vergrößerte, geschwollene Zellen mit peripheren, zytoplasmatischen TP-Einschlüssen beobachtet. In den Gliazellen befinden sich die TP-Ansammlungen nahe der Zellmembran, sowohl in den Astrozyten-Fortsätzen als auch im Zellkörper (Rizzu et al. 2000; Seilhean et al. 2011). In diesen Tau-Aggregaten werden Veränderungen des Verhältnisses von 4R- zu 3R-Tau beobachtet, wobei dort sowohl normales als auch mutiertes 4R-Tau nachzuweisen ist (Rizzu et al. 2000).

Familien mit der P301L-Mutation haben in der phänotypischen Ausprägung frühe Verhaltensauffälligkeiten gemeinsam, insbesondere Enthemmung und sprachliche Defizite. Jedoch gibt es auch einige Variabilität zwischen den Familien mit der gleichen Mutation, die einen zusätzlichen Einfluss von Umwelt- und/oder anderen genetischen Faktoren vermuten lassen (Bird et al. 1999; D'Souza et al. 2005). Auch ist ein Patient mit familiärer semantischer Demenz beschrieben, bei dem die P301L-Mutation nachgewiesen werden konnte (Ishizuka et al. 2011).

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser medizinischen Promotionsarbeit ist, die Untersuchung der möglichen neuroprotektiven Eigenschaft Perineuronaler Netze anhand der Vulnerabilität der netztragenden Zellen gegenüber Tau-Protein-Hyperphosphorylierungen und Neurofibrillären Tangles in einem Modell der Frontotemporalen Demenz. In diesem Mausmodell der P301L-Mutation des TP, die eine Form der Frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17) verursacht, soll hinterfragt werden, ob das Auftreten der TP-Veränderungen bevorzugt in Neuronen ohne PN auftritt.

Die Hypothesen sind :

- 1.) Netztragende Neuronen sind weniger von der Pathologie der neurodegenerativen Erkrankung betroffen
- 2.) Mit fortschreitender Erkrankung findet keine Abnahme in der Anzahl der PN statt.

Die Untersuchung dieser Hypothesen erfolgte mittels immunhistochemischer Markierungen von Hirnschnitten. Des Weiteren wurden Proteinnachweise mittels Western Blot durchgeführt.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Zur Untersuchung der Fragestellungen wurden immunhistochemische Färbungen und ein Western Blot durchgeführt. Dafür wurden folgende Geräte genutzt:

Tab. 2-1 Geräte

Geräte	Hersteller
Eppendorf Reference (Pipetten)	Eppendorf
Filter Tip (Pipettenspitzen)	Greiner bio-one
Sterile Femtotips	Eppendorf
Waage	Satorius
Vortex	Scientific Industries
Taumler (Polymax 1040)	Heidolph Instruments
Kühlschrank	Liebherr
Heizvorrichtung	Medite Medizintechnik
Thermomixer	Eppendorf
Gefriermikrotom	Leica
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
AxioCam MRm	Zeiss
24-Well-Culture-Plate	Greiner bio-one
Polyvinylidenuoxid (PVDF)-Membran	PerkinElmer, USA
Filterpapier	Gel Blotting Paper, Schleicher & Schuell
Kodak-Imaging-Station	Kodak

2.1 P301L-Mäuse

2.1.1 Mausmodell P301L

Ausgewachsene Wiltyp-Mäuse exprimieren, im Gegensatz zum Menschen, ausschließlich 4R-Tau-Isoformen. Die Tau-Proteine von Menschen und Mäusen besitzen gleiche Sequenzen, und unterscheiden sich nur am N-terminalen Bereich in 14 Aminosäuren (Andorfer et al. 2003). Die in dieser Arbeit untersuchten transgenen P301L-Mäuse exprimieren statt des Wildtyp-Maus-Tau-Proteins das humane Mikrotubuli-assoziierte Protein mit der P301L-Mutation (4R/ON). Als Promoter dient hier der Prion-Protein-Promoter der Maus (Borchelt et al. 1996; Lewis et al. 2000; Lin et al. 2003). Aufgrund dieser genetischen Veränderung bilden die Mäuse die Taupathologie aus und imitieren den Phänotyp der FTDP-17 des Menschen. Akkumulationen und NFT des Proteins in Neuronen und Gliazellen von Neokortex, Hippocampus und im Limbischen System sowie der Untergang von Neuronen sind die Folge (Götz et al. 2000; Lewis et

al. 2000; Lin et al. 2003; Deters et al. 2008; Ramsden et al. 2005). Mit fortschreitendem Alter der Mäuse nehmen die histologisch sichtbaren Ausprägungen der Pathologie zu, einhergehend mit Störungen in Gedächtnis und Kognition. Weiterhin ist die progressive Beeinträchtigung der Motorik der P301L-Mäuse charakteristisch. Veranschaulicht werden kann dieser Sachverhalt anhand des Rotarod-Versuches, bei dem die P301L-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit zunehmendem Alter schlechter abschnitten und deutliche motorische Störungen zeigen, signifikant ab dem siebten Monat (die Ergebnisse dieses Testes wurden freundlicherweise bereitgestellt von PD Dr. Max Holzer vom Paul-Flechsing-Institut Leipzig). Jedoch unterscheiden sich die männlichen und weiblichen P301L-Mäuse stark in der Ausprägung des Phenotyps voneinander. Die weiblichen Tiere zeigen mikroskopisch weitaus mehr TP-Expressionen und -Aggregationen. Auch ist die motorische Beeinträchtigung aufgrund der Mutation bei den weiblichen Mäusen ausgeprägter.

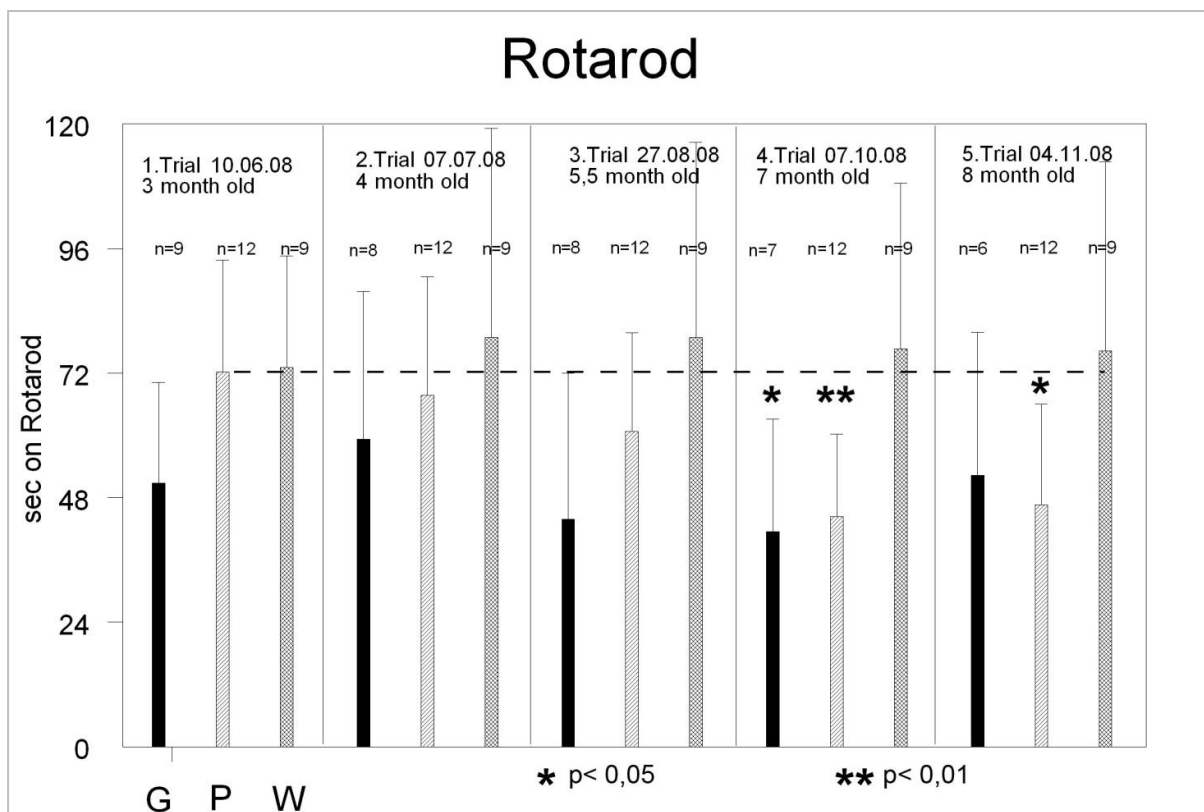


Abb. 2-1 Rotarod-Versuch mit Mäusen vom Wildtyp-(W), mit der P301L-Mutation (P) und mit Tau-Knockout (G) (Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Max Holzer, Paul-Flechsing-Institut für Hirnforschung Leipzig)

Für die immunhisochemische Untersuchung wurden deshalb je drei weibliche Mäuse im Alter von drei und achteinhalb Monaten verwendet, die diese Mutation im Gen P301L mit Hilfe des Maus-Prion-Protein-Promotors exprimieren. Im Western Blot wurden weibliche und männliche P301L-Mäuse untersucht. Bezüglich des Genotyps waren die Mäuse homozygot und besaßen

statt des endogenen Wildtyp-Maus-Gens das humane Gen des TP. Alle Tiere stammen aus der Zucht des Medizinisch-Experimentellen Zentrums Leipzigs.

Tab. 2-2 Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten P301L-Mäuse

Name	Geschlecht	Alter
P287	♀	3 Monate
P301	♀	3 Monate
P302	♀	3 Monate
P264	♀	8,5 Monate
P265	♀	8,5 Monate
P266	♀	8,5 Monate
WT	♀	3 Monate
WT	♀	10,5 Monate

Des Weiteren wurden als Negativkontrolle zwei Wildtyp-Mäuse (WT) vom Stamm C57/BL6 im Alter von drei und zehneinhalb Monaten des zentralen Tierstalls des Medizinisch-Experimentellen Zentrums Leipzigs untersucht um ein Vorhandensein von pathologischen Tau-Protein-Ablagerungen in den genetisch unveränderten Mäusen auszuschließen.

2.1.2 Präparation des Hirngewebes

Um das Material für die Anfertigung von Hirnschnitten zu präparieren, wurde zunächst der Thorax der mit CO₂ narkotisierten Maus eröffnet. Mit Hilfe einer Spritze wurde in die Herzspitze eingestochen und physiologische Natriumchlorid(NaCl)-Lösungen mit 0,1%-iger Heparin-Lösung in das Herz-Kreislaufsystem gespült. Anschließend erfolgte die Perfusion mit einer Fixierlösung bestehend aus Phosphatpuffer, 4% Paraformaldehyd (PFA) und 0,1% Glutaraldehyd gelöst in PBS mit dem pH-Wert 7.4. Das Gehirn konnte nun entnommen, über Nacht in der beschriebenen Fixierlösung und anschließend in Phosphatpuffer mit 30% Saccharose inkubiert werden. Damit eine Konservierung des Materials über mehrere Wochen ermöglicht werden konnte, wurde der Lösung 0,1% Natriumazid (NaN₃) beigesetzt, das die Ansammlung von Mikroorganismen am Gewebe verhindert.

Nachdem sich die Saccharose in den Zellen des Gewebes angereichert hat – dies zeigt sich im Herabsinken des Gehirns auf den Boden des Gefäßes – kann das Gehirn geschnitten werden. Für die Untersuchung wurden 30µm dicke Hirnschnitte mittels eines Gefriermikrotoms angefertigt und in Platten mit 24 Kavitäten mit PBS-Natriumazid-Lösung gelagert.

2.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Markierung wurden Hirnschnitte ausgesucht, die die zuvor ausgewählten Regionen aufwiesen. So standen besonders der somatosensorische und entorhinale Kortex, Hippocampus, Nucleus ruber, Substantia nigra und der motorische Trigemuskern im Zentrum der Beobachtungen.

Tab. 2-3 Puffer-und Blockerlösungen für die Immunhistochemie

PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,4)	In 1 l Aqua dest.: 1,7 mmol NaH_2PO_4 5,2 mmol Na_2HPO_4 150 mmol NaCl 2,7 mmol KCl
PBS – Natriumazid	PBS 1,0 g (15 mmol) NaN_3
PBS – Tween	PBS 0,05 % Tween®-20
TBS (Tris buffered saline, pH 7,4)	In 1 l Aqua dest.: 10 mMol Tris (Tris(hydroxymethyl)- aminomethan, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) 150 mmol NaCl pH-Einstellung mit HCL
Glycin-NaOH pH 10,4	In 1 l Aqua dest.: 7,505 g (0,1 mol) Glycin 5,85 g (0,1 mol) NaCl 1 mmol ZnCl_2 1 mmol MgCl_2
Blockerlösung	In 1 l PBS-Tween: 2 % BSA (bovines Serumalbumin) 0,3 % Milchpulver 0,5 % Eselnormalsesum

2.2.1 Fluoreszenzmarkierung

Die 30 μm dicken Schnitte wurden zunächst dreimal fünf Minuten in PBS-T gewaschen. Um unspezifische Bindungen im Gewebe zu minimieren, folgte die Inkubation des Gewebes für mindestens 30 Minuten in einer Blockerlösung, die die Maskierung der unspezifischen Bindungsstellen bewirkt. Nun wurde das Hirnmaterial über Nacht in einem Gemisch aus Blockerlösung und primären Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Untersuchung der Beziehung zueinander sollten bei den gewählten Schnittebenen sowohl die TP-Veränderungen als auch die PN sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden die Antikörper (AK) PT205 und HAG in den Verdünnungen 1:500 und 1:10 verwendet. Der polyklonale AK PT205 detektiert hyperphosphoryliertes TP an der phosphorylierten Aminosäure Threonin 205, das eine Vorstufe der TP-Pathologie darstellt (Alonso et al. 2001). HAG hingegen bindet an Aggrekan, das Hauptprotein der Perineuronalen Netze, sowohl beim

humanen Gehirn als auch bei anderen Säugetier-Gehirnen (Morawski et al. 2010b; Morawski et al. 2010a).

Tab. 2-4 Verwendete primäre Antikörper

Markierte Strukturen	Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nummer
<i>Tau-Protein</i>				
Phosphotau-205 (PT205)	Kaninchen anti-humanes-Tau PT205	1:500	Invitrogen	#5193173
Anti-Phospho-(Ser-212/Thr-214)Tau-100 (AT100)	Maus anti Tau	1:500	Pierce Endogen	MN1060
Tau-1	Maus anti Tau	1:1000	Millipore	MAB3420
<i>PN-Bestandteile</i>				
Humanes Anti-Aggregan 7D4 (HAG)	Maus anti-humanen Aggregan (HAG7D4)	1:10	Serotec	MCA1454
Anti-humanen cartilage link protein1 (Crtl-1/ HAPLN1)	Ziege anti-humanen CRTL1/ (HAPLN1)	1:500	R&D Systems Inc.	# VBN 0107081
<i>Neurone</i>				
Maus-Neurales Kernprotein (NeuN)	Maus anti-NeuN, clone A60	1:150	Millipore	MAB 377

Um auch die Anzahl der NFTs in den untersuchten Regionen festzustellen, wurden benachbarte Hirnschnitte mit dem primären AK AT100 immunhistochemisch detektiert. AT100 bindet an das doppelt phosphorylierte Epitop Threonin 212 und Serin 214 und ist einer der spezifischsten Antikörper zur Darstellung von NFTs (Gärtner et al. 1998; Augustinack et al. 2002). Da auch hier die Lage der NFTs zu den PN für die Beobachtungen interessant war, wurde der AK Crtl-1/HAPLN1 verwendet, der das Link-Protein der PN markiert. Außerdem wurden parallel zu den beschriebenen Ansätzen Folgeschnitte mit dem Neuronenmarker NeuN (Verdünnung 1:150) inkubiert, um die Anzahl aller Neuronen der Schnittebenen zu erfassen.

Die weitere Behandlung des Gewebes bestand im wiederholten drei-maligen Waschen in PBS-T sowie der einstündigen Inkubation in einer Lösung aus Blocker (50%), PBS-T (50%) mit den sekundären AK. Die Darstellung der PN mit dem primären AK HAG wurden dabei mit Indocarbocyanin-2(Cy2)-gekoppeltem Esel-anti-Maus-AK (DaMCy2, 1:200), die mit Crtl-1 dargestellten PN hingegen mit Indocarbocyanin-3(Cy3)-gekoppeltem Esel-anti Ziege (DaGCy3,

1:250), die Tau-Protein-Hyperphosphorylierungen mit Cy3-gekoppeltem Esel-anti-Kaninchen-AK (DaRbCy3, 1:400), die NFT mit Cy2-gekoppeltem Esel-anti Maus-AK (DaMCy2, 1:200) und die Neuronen mit Cy3-gekoppeltem Esel-anti-Maus-AK (DaMCy3, 1:1000) markiert. Danach folgten erneute Waschschr tte in PBS-T und das Aufziehen der Schnitte auf Objektträger.

Tab. 2-5 Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Cy3-gekoppeltes Esel-anti Kaninchen	1:400	Jackson Immuno Research
Cy3-gekoppeltes Esel-anti Maus	1:1000	Jackson Immuno Research
Cy2-gekoppeltes Esel-anti Kaninchen	1:300	Jackson Immuno Research
Cy2-gekoppeltes Esel-anti Maus	1:200	Jackson Immuno Research
Cy3-gekoppeltes Esel-anti Ziege	1:250	Jackson Immuno Research
ExtrAvidin�-Peroxidase	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Esel-anti Maus biotinyliert	1:1000	Jackson Immuno Research
Esel-anti Ziege biotinyliert	1:1000	Jackson Immuno Research

Nachdem die Hirnschnitte auf den Objektträgern getrocknet waren, wurden diese in aufsteigender Alkoholreihe (70% → 80% → 90% → 100%) und Toluol (I → II → III) entwässert und anschließend mit Entellan  eingedeckt. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tab. 2-6 Weitere Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth
BSA (Rinderserum-Albumin)	Roth
Eselnormalserum	Jackson Immuno Research
Tween�-20	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ (30%ig)	Merck
Methanol CH ₄ O (60%ig)	Roth
Nickelammoniumsulfat	Sigma-Aldrich
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich
Saccharose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Roth
Heparin	Ratiopharm
Glutaraldehyd	SERVA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Toluol	Roth
Entellan�	Merck

2.2.2 Avidin-Biotin-Markierung

Um die Verteilung des humanen Tau-Proteins sowohl in den von PN umschlossenen als auch in den PN-freien Zellen nachzuweisen, wurden einige Hirnschnitte mit der Avidin-Biotin-Methode mit Hilfe von Nickel-DAB-Verstärkung behandelt.

Diese Färbemethode wird ähnlich durchgeführt wie die oben beschriebene Fluoreszenzmarkierung. Sie basiert jedoch auf dem Prinzip des Immunperoxidase-Verfahrens. Hierbei werden die nachzuweisenden Strukturen durch die Reaktion von Peroxidase mit einem Chromogen sichtbar gemacht. Folglich muss die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen inaktiviert werden, bevor die Inkubation mit den primären Antikörpern durchgeführt wird. Dies geschah nach dem anfänglichen dreimaligen Waschen durch einstündige Inkubation in PBS-T-Lösung, versetzt mit je 1% Wasserstoffperoxid und Methanol.

Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern über Nacht und drei Waschschritten in PBS-T erfolgt die Behandlung der Schnitte mit den sekundären AK. Diese sekundären AK sind mit Biotin konjugiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit und erneutem dreimaligen Waschen folgt eine weitere Inkubation des Materials in einer Avidin-Lösung. Avidin ist ein Eiweißglykoprotein, das vier Moleküle des Biotins binden kann und in diesem Fall mit Peroxidase konjugiert ist. Diese Peroxidase wird schließlich mit einem Chromogen sichtbar gemacht, in diesem Fall Nickel-DAB.

Für die Darstellung des humanen TP in den Zellen wurde der monoklonale AK Tau-1 in der Verdünnung 1:1000 verwendet. Aufgrund der guten Erfahrungen mit dem PN-markierenden primären Antikörper HAG, wurde dieser auch hier verwendet. HAG ist jedoch auch ein monoklonaler AK aus der Maus, so dass zunächst nur die Markierung des Tau-Proteins erfolgte und die Färbung der PN am Hirngewebe erst nach anschließender Darstellung der Struktur durch die Avidin-Biotin-Methode durchgeführt werden konnte.

2.2.3 Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

Zur Auswertung der Fluoreszenzfärbungen wurde das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M genutzt. Mit dem dazugehörigen Computerprogramm Axiovision 4.6 und einem motorisierten Maerzhäuser Objektisch ermöglicht es die Aufnahme von Übersichtsbildern von den einzelnen Hirnschnitten, zusammengesetzt wie ein Mosaik aus Einzelbildern. Mit Hilfe dieser Übersichtsaufnahmen konnten die gesuchten Hirnareale gezielt aufgesucht und analysiert werden. Um die definierten Areale wurden Rechtecke mit Flächen von etwa 0,2 bis 1,5 mm² (je nach Hirngebiet) festgelegt, in denen schließlich die Anzahl der PN, der TP-HP, der NFT sowie der Gesamtneuronenzahl ausgezählt wurden. Die gezählten Zellen wurden schließlich umgerechnet in die Anzahl positiver Zellen je mm², so dass sie untereinander verglichen werden konnten. So wurde jeder untersuchte Hirnschnitt eingescannt und die jeweiligen gefärbten Neurone in den festgelegten Gebieten gezählt. Die abschließende Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0.

2.3 Western Blot

Zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten primären AK wurde eine Analyse mittels Western-Blot durchgeführt. Hierfür wurden wiederum Wildtyp- sowie männliche und weibliche P301L-Mäuse untersucht. Das Alter der Tiere betrug zehn Monate.

Der Western Blot besteht aus folgenden Arbeitsschritten:

1. Homogenisierung des Hirngewebes
2. Auftrennung der Proteine mit Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-(SDS-) Elektrophorese
3. Blotting der elektrophoretisch aufgetrennten Moleküle auf einer Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran,
4. Immunoblot mit Peroxidase-vermittelter Farbreaktion.

Für die Durchführung des Blots ist zunächst eine Homogenisierung des Hirngewebes notwendig. Dies geschah mittels Assemblierungspuffer, Protease-Inhibitoren (50-fache Stammlösung, complete© Roche) und Ultra-Turrax (IKA-Werke, D) auf Eis. Das dabei entstandene Homogenisat wurde für 30 Minuten zentrifugiert (bei 50,000xg 4°C, 3K30 Sigma) und deren Überstand auf 20% Glycerol in neue Tubes überführt. Anschließend wurde Guanin-Triphosphat (GTP) hinzugegeben mit einer Endkonzentration von 1mMol GTP (entspricht 523g/mol). Nach anschließender Inkubation für 30 Minuten bei 37°C im Thermomixer bei 600rpm erfolgte die Unterschichtung des Homogenisats mit 400µl Saccharose-Lösung (30% in Assemblierungspuffer auf 37°C) und die erneute Zentrifugation bei 40000xg und 37°C für 30 Minuten. Der Tubulin, TP und andere Zytoskelett-Proteine enthaltende Überstand wurde auf Eis aufgehoben und die Saccharoseschicht vorsichtig abgenommen und verworfen.

Tab. 2-7 Assemblierungspuffer

Reagenz	Konzentration
Morpholinoethansulfonsäure (Mes)	100 mmol
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	2 mmol
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	0,1 mmol
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	0,5 mmol
Triton X 100	0,5 %
Proteas-Inhibitoren 50-fach (complete© Roche)	

Für die Elektrophorese wurden 10µl Lysat mit 200µl SDS-Probenpuffer gemischt mit anschließender zweiminütiger Erhitzung der Proben auf 95°C.

Nun konnte die Auftrennung des Proteingemisches durch die SDS-Gelelektrophorese erfolgen: Nach Herstellung des Trenngels, Start der Polymerisation desgleichen durch APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED und Aushärtung, wurde es mit dem Sammelgel

überschichtet. Pro Bande wurden 20µl Protein in SDS-Probenpuffer aufgetrennt und mit Coomassie-R-20 gefärbt.

Tab. 2-8 Acrylamid-SL-SDS-Gel

Reagenz	Konzentration/Menge
Acrylamid	29,19 %
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,81 %
Zweifach destilliertes Wasser	100 ml
Rotiphoese-Stammlösung	

Tab. 2-9 Trenngel (10%ig)

Reagenz	Konzentration/Menge
Zweifach destilliertes Wasser	4,85 ml
Tris (pH 8,8)	375 mmol
Acrylamid-SL	10 %
SDS-SL	0,1 %
Start mit:	
APS-SL (10%ig)	50 µl
TEMED	10 µl

Tab. 2-10 Sammelgel (4,3%ig)

Reagenz	Konzentration/Menge
Zweifach destilliertes Wasser	3,05 ml
Tris pH 6,8	125 mmol
Acrylamid-SL	4,3 %
SDS	0,1 %
Start mit:	
APS-SL (10%ig)	25 µl
TEMED	10 µl

Tab. 2-11 SDS-Probenpuffer

Reagenz	Konzentration/Menge
Zweifach destilliertes Wasser	8,4 ml
Tris/ HCL pH 6,8	62,5 mM
Glycerol	10 %
SDS-SL (0,1 g/ml)	2 %
β-Mercaptoethanol	5 %
Bromphenolblau	Krümel

Tab. 2-12 Laufpuffer

Reagenz	Konzentration/Menge
Glycin	192 mmol
Tris	25 mmol
SDS	0,1 %
Zweifach destilliertes Wasser	2,0 l

Anschließend wurde das Gel im Bierrum-und Schäfer-Nielson-Blotpuffer gespült und eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mit Methanol befeuchtet und dann für zehn Minuten in Blotpuffer eingelegt. Auch das Filterpapier (insgesamt 2 Stück) wird für zehn Minuten in Blotpuffer gelegt. Nun wurde auf die untere Seite des Blotters das erste Filterpapier aufgelegt, dann die Membran, das Gel und schließlich das zweite Filterpapier. Der Blotter wurde geschlossen und die Proteine bei 10-15 V und etwa 0,2 mA/cm² auf die Membran übertragen. Danach erfolgte zweimaliges Waschen für fünf Minuten in TBS-T.

Tab. 2-13 Bierrum-und Schäfer-Nielsen-Blotpuffer für SDS-Proteine

Reagenz	Konzentration
Tris	48 mMol
Glycin	39 mMol
SDS-SL (0,1 g/ml)	0,004 %
Methanol	20%
Zweifach destilliertes Wasser	

Tab. 2-14 TBS-T-Puffer

Reagenz	Konzentration
Tris	10 mMol
NaCl	150 mMol
Tween 20-SL (10%)	0,05 %
HCl	pH auf 7,4 einstellen

Tab. 2-15 Verwendete primäre Antikörper

Markierte Strukturen	Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nummer
Phosphotau Thr-205 (PT205)	Kaninchen anti humanes-Tau PT205	1:2000	Invitrogen	#5193173
Anti-Phospho-(Ser-212/Thr-214)Tau 100 (AT100)	Maus anti Tau	1:300	ThermoScientific	MN1060
Aggrecan core protein (Acan), clone cat-301	Maus anti Aggrecan	1:1000	Millipore	MAB5284
Anti-humanese cartilage link protein1 (Crtl-1/HAPLN1)	Ziege anti-humanese CRTL1 (HAPLN1)	1:500	R&D Systems Inc.	# VBN 0107081

Tab. 2-16 Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Anti-Maus Ig-HRP	1:10000	GE Healthcare	NXA931
Anti-Kaninchen IgG-HRP	1:10000	GE Healthcare	NA934V
Anti-Ziege Ig-HRP	1:10000	Dako	P0449

Um die Hyperphosphorylierungen (HP) und Aggregationen des TP darzustellen war nun ein Immunoblot mit monoklonalen primären AK (siehe Tabelle 2-15) und Peroxidase-markierten sekundären AK notwendig.

Auch hier kamen die AK PT205 und AT100 zum Einsatz. PT205 mit Bindung an die phosphorylierte Aminosäure Threonin-205 zur Darstellung von HP des TP (Gärtner et al. 1998; Alonso et al. 2001) und AT100 mit Bindung an das doppelt phosphorylierte Epitop Threonin 212 und Serin 214 zur Darstellung von NFTs (Augustinack et al. 2002). Der AK Acan markiert, wie der in der immunhistochemischen Färbung verwendete AK HAG, das Aggrecan der PN. Der AK Crtl1 bindet an das Link-Protein der PN.

Zunächst mussten die unspezifischen Bindungsstellen geblockt werden. Dafür wurde die Membran in 0.5 % Gelatine/0.5 % Rinderserumalbumin in TBS-T für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal sechs Minuten mit TBS-T gespült. Dann erfolgte die 60-minütige Inkubation mit dem primären AK, der zuvor mit TBS-T verdünnt wurde (Verdünnungen siehe Tabelle 2-15). Auch hier wurde die Membran anschließend dreimal sechs Minuten in TBS-T gespült. Nun konnte die Membran mit dem, in TBS-T verdünnten, sekundären AK (anti-Maus-POD 1:10000) inkubiert werden. Nach 45 Minuten wurde die Membran viermal sechs Minuten gespült. Da der sekundäre AK mit Peroxidase markiert ist, musste nun eine Entwicklerlösung hergestellt werden. (siehe temporäre Entwicklerlösung Tabelle 2-16). Die Membran wurde in diese für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach konnte der Western-Blot mit der Kodak-Imaging-Station fotografiert und ausgewertet werden.

Tab. 2-17 Temporäre Entwicklerlösung

Lösung A	50 mg Luminol 0,1 M Tris/HCl pH 8,6
Lösung B	11 mg p-Hydroxy-Coumarinsäure 10 ml DMSO
Lösung A + Lösung B	10 ml Lösung A 3 µl H ₂ O ₂ (30%) 1 ml Lösung B (auf Eis)

2.4 Statistische Methoden

Aufgrund der geringen Stichprobenzahl sowie der großen Spannweiten in der Anzahl der ausgezählten Neuronenpopulationen ist nur eine geringfügige Anwendung statischer Methoden möglich. Für die Überlegung, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von TP-Veränderungen und PN gibt, wurden die Ergebnisse der Auszählungen in Neuronen pro mm² umgerechnet und je Maus und Hirnregion in einer Vierfeldertafel notiert. Mit Hilfe dieser Vierfeldertafeln wurden die Odds Ratios (OR) errechnet.

2-18 Vierfeldertafel

	TP-Pathologie	ohne TP-Pathologie	
PN	a	b	a + b
N	c	d	c + d
	a + c	b + d	N=a+b+c+d

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Da die OR nicht definiert ist, wenn eine dieser Variablen Null beträgt, konnte in diesen Fällen die korrigierte OR mittels der sogenannten „Delta-Option“ errechnet werden. Diese besteht in der Erhöhung aller Vierfelderhäufigkeiten um jeweils 0,5 (Bortz, Lienert 2008; Hilgers et al. 2007).

$$OR' = \frac{(a+0,5) \times (d+0,5)}{(b+0,5) \times (c+0,5)}$$

Des Weiteren wurden mittels der logistischen Regression die sogenannten Logits aus den OR errechnet. Diese Logits transformieren den nach unten eingeschränkten Wertebereich der OR, die sich der Null nur asymptotisch nähern kann, in einen unbeschränkten Wertebereich.

$$\text{Logits} = \ln(OR)$$

Zur Berechnung eines möglichen signifikanten Unterschiedes in der Anzahl der PN im Altersvergleich sowie im Vergleich der P301L-Tiere mit denen vom WT wurde der T-Test für zwei unabhängige Stichproben angewandt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt. Die Berechnung wurde mit Hilfe des Computerprogramms „Origin6.1“ durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

In der Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit soll ein Überblick über Verteilung der PN, sowie über die Verteilung der TP-Veränderungen in den untersuchten Hirnregionen der P301L-Mäuse gegeben werden. Dabei werden zwei verschiedene Altersgruppen miteinander verglichen. Anschließend erfolgt die genauere Ausführung hinsichtlich der Zielstellung der Arbeit, in der untersucht wird, ob PN protektive Eigenschaften in Bezug auf Pathologien des TP vermuten lassen.

Zwei Kontingenztafeln (Tab. 3-1 und 3-2) geben eine Übersicht über die Ergebnisse der Auszählungen. Sie zeigen die jeweiligen Anteile der PN sowie des hyperphosphorylierten TP (einschließlich der NFTs) an der Gesamtheit aller gezählten Neurone. Auch die Schnittmengen beider Parameter – hier rot dargestellt – lassen sich entnehmen. Weitere Erläuterungen zu diesen Tabellen werden in den folgenden Abschnitten gegeben.

Tab. 3-1 Kontingenztafel drei Monate alte P301L-Maus, in Neurone je mm² sowie %

	Merkmal Neurone ohne PN	Merkmalsausprägung Neurone mit PN	Randsummen
Merkmal Neurone ohne TP-HP bzw. NFT	a = 1374,55 85,15%	b = 168,69 10,78%	n1 = a + b = 1543,24 95,93%
Merkmalsausprägung Neurone mit TP-HP bzw. NFT	c = 66,55 4,12%	d = 4,55 0,28%	n2 = c + d = 71,1 4,4%
Randsummen	a + c = 1441,1 88,98%	b + d = 173,24 11,06%	n = a+b+c+d = 1614,34 100%

Tab. 3-2 Kontingenztafel achteinhalb Monate alte P301L-Maus, in Neurone je mm² sowie %

	Merkmal Neurone ohne PN	Merkmalsausprägung Neurone mit PN	Randsummen
Merkmal Neurone ohne TP-HP bzw. NFT	a = 1316,27 84,58%	b = 144,85 9,31%	n1 = a + b = 1461,12 93,89%
Merkmalsausprägung Neurone mit TP-HP bzw. NFT	c = 77,49 4,98%	d = 17,63 1,13%	n2 = c + d = 95,12 6,11%
Randsummen	a + c = 1393,76 89,56%	b + d = 162,48 10,44%	n = a+b+c+d = 1556,24 100%

3.1 Vorkommen der Perineuronalen Netze in den untersuchten Regionen der P301L- und der Wildtyp-Mäuse

Wie den beiden Kontingenztafeln der Tabellen 3-1 und 3-2 zu entnehmen ist, besitzen im Mittel zwischen 10,4% und 11,1% aller in dieser Arbeit gezählten Neurone ein PN. Da die Häufigkeit der PN regionsspezifisch variiert, wurden für diese Untersuchung Hirnareale ausgewählt, die sich bezüglich der Anzahl netztragender Neurone teilweise stark voneinander unterscheiden.

Der Motorische Trigemuskern (Mo5) kann als netzreich betrachtet werden: Etwa 87% der in der Arbeit ausgezählten Neuronen des Mo5 besitzen ein PN. Die Zellen der Pars reticulata der Substantia nigra (SN-r) tragen zu 62% PN und die der Pars magnocellularis des Nucleus ruber (NR-m) zu 37%. Hingegen zählen der Hippocampus (Hipp) und der Entorhinale Kortex (EC) mit weniger als 1% netztragender Zellen zu den netzarmen Regionen. Im Primären Somatosensorischen Kortex (PSC) macht der Anteil der PN in den untersuchten P301L-Mäusen rund 7% aus.

Im Vergleich der Anzahl der netztragenden Neurone der Wildtyp (WT)-und der P301L-Mäuse konnten bei einem Signifikanzniveau von 5% Irrtumswahrscheinlichkeit keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden: Der Vergleich der Anzahl der PN in den drei Monate alten P301L-Mäusen und den drei Monate alten WT-Maus ergab einen p-Wert von 0,97. Auch in den älteren Tieren gab es mit einem Signifikanzwert von $p=0,92$ keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und P301L-Mutation.

Tab. 3-3 t- und p-Wert-Ergebnisse des T-Tests für zwei unabhängige Stichproben: Analyse der Anzahlen der PN-tragenden Neurone im Vergleich der 3 und 8 Monate alten P301L-Mäuse

	PSC	Hipp	EC	NR-m	SN-r	Mo5
t-Wert	1,92	-1,32	0,95	0,57	-0,16	0,93
p-Wert	0,13	0,26	0,40	0,60	0,88	0,41

Auch im Altersvergleich, und folglich mit fortschreitendem Krankheitsstadium der Mäuse, konnten keine Veränderungen in den Anzahlen der PN beobachten werden. Die Nullhypothese, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen in der Anzahl netztragender Neurone gibt, kann bei p-Werten $>0,05$ nicht verworfen werden. Dies spricht gegen einen zunehmenden Untergang der netztragenden Neurone mit der Krankheitsprogression.

3.2 Tau-Protein und Tau-Protein-Veränderungen bei der P301L-Maus

Um bei den P301L-Tieren die gleichmäßige Verteilung des Tau-Proteins (TP) in allen Neuronen vor Beginn der Untersuchungen nachzuweisen, wurden zunächst einige Hirnschnitte mit Hilfe der Peroxidase-vermittelten Biotin-Avidin-Methode angefärbt. Hier war das Protein sowohl in netztragenden als auch in nicht netztragenden Neuronen darstellbar.

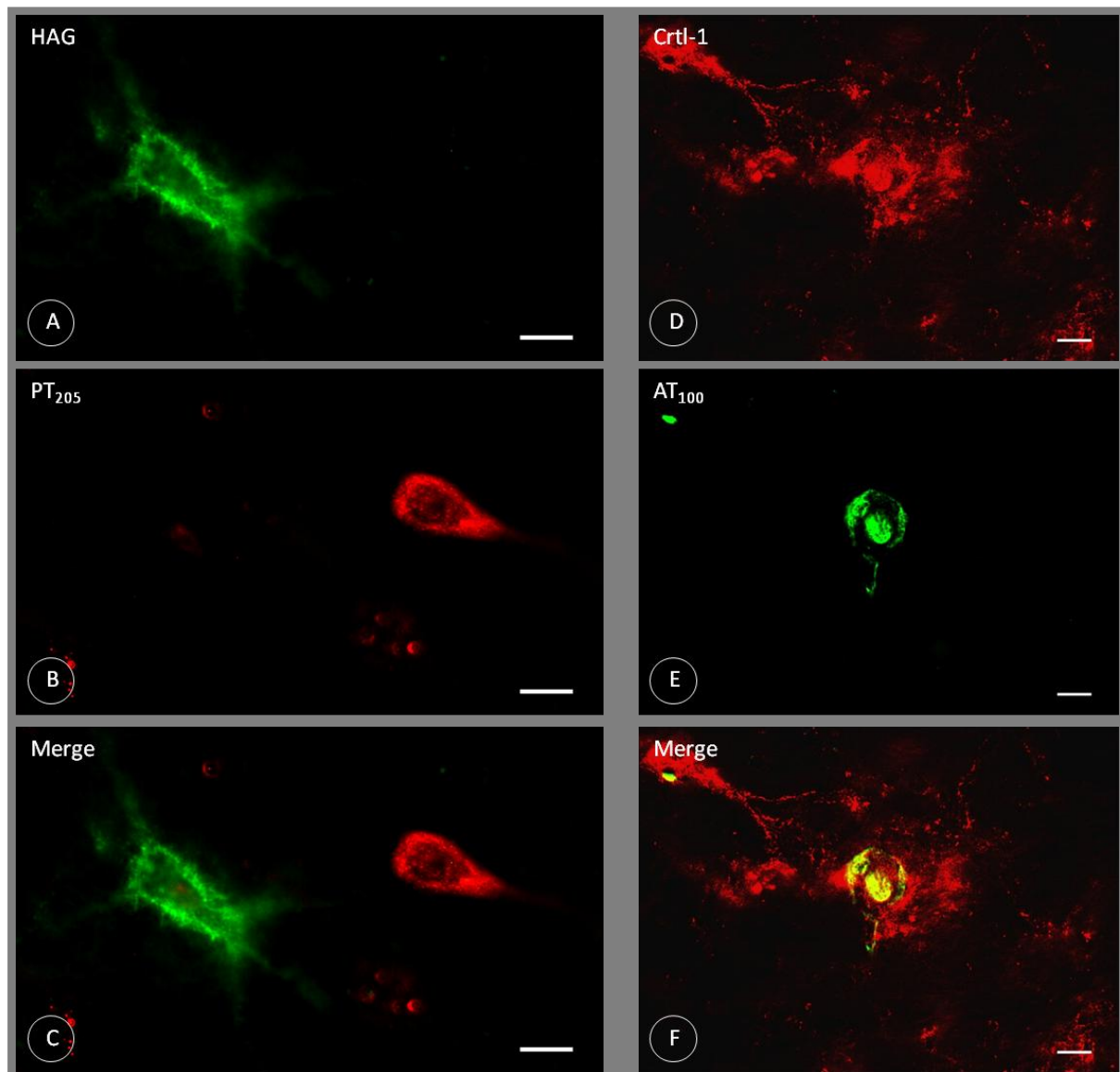


Abb. 3-1 A,B und C: Darstellung einer Tau-Hyperphosphorylierung mit PT205 (rot) und eines Perineuronalen Netzes mit HAG (grün); D,E und F: Darstellung eines Neurofibrillären Tangles mit AT100 (grün) und eines Perineuronalen Netzes mit Crtl-1 (rot), Maßstab 10µm

Mit Hilfe der für die immunhistochemische Markierung verwendeten Antikörper Phosphotau 205 (PT205) und Anti-Tau 100 (AT100) war es möglich, zwei verschiedene Phosphorylierungsstadien des Tau-Proteins zu detektieren (Alonso et al. 2001; Augustinack et

al. 2002): Die Pretangle-Strukturen der potentiell reversiblen Hyperphosphorylierungen (HP) wurden mittels PT205 markiert, die irreversiblen Tau-Protein-Aggregationen der Neurofibrillären Tangles (NFT) mittels AT100 (siehe Abbildung 3-1).

In den Tabellen 3-1 und 3-2 sind die Anteile des veränderten TP (HP und NFT zusammengefasst) aller gezählten Neuronen zu entnehmen. Der Anteil in den jungen Mäusen beträgt 4,4% und ist im vorangeschrittenen Alter von achteinhalb Monaten auf etwa 6,1% gewachsen. Diese aus den untersuchten Hirnarealen gemittelten Anteile dienen jedoch nur der Übersicht, da auch die Ausprägung der TP-Ablagerungen regional sehr variiert.

Getrennt nach den Hirnregionen sind in der Abbildung 3-2 die Anteile der mit TP-Ablagerungen gezählten Zellen im Altersvergleich dargestellt. So lässt sich die unterschiedliche regionale und altersspezifische Ausprägung der Erkrankung verdeutlichen.

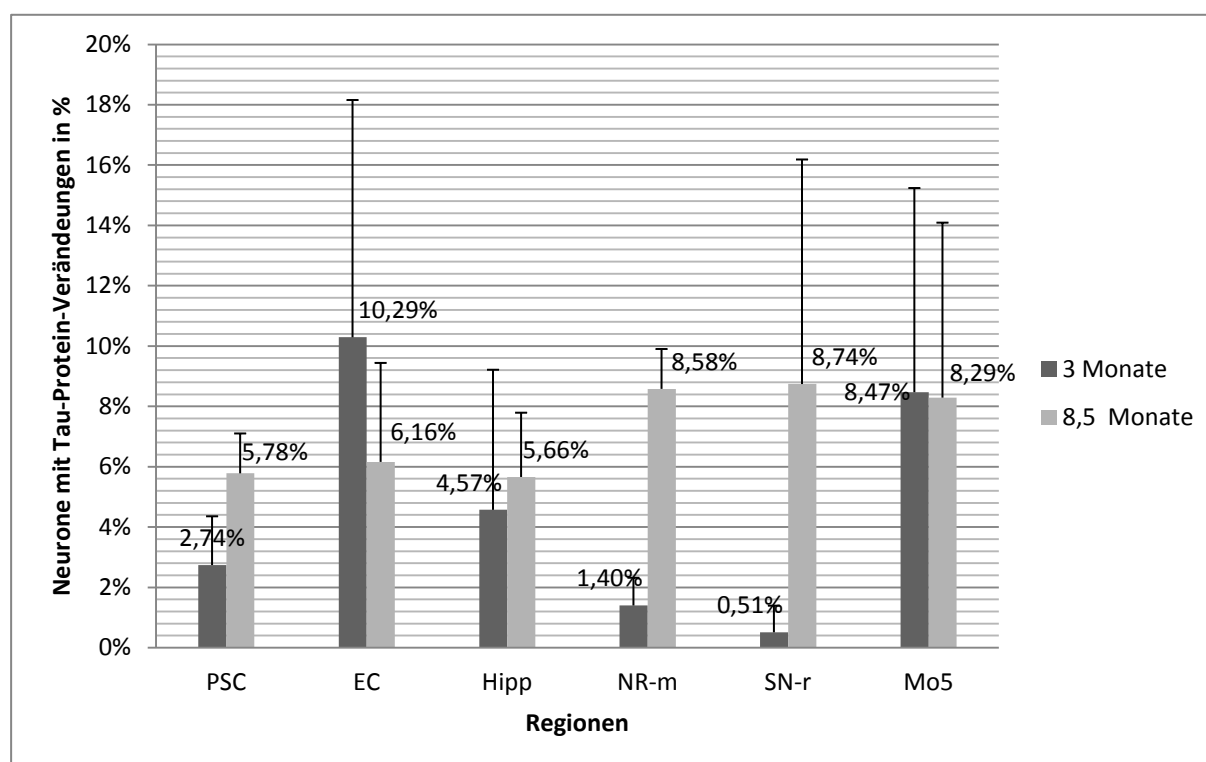


Abb. 3-2 Darstellung der durchschnittlichen regionalen Ausprägungen der Tau-Protein-Veränderungen (HP sowie NFTs, markiert durch die AK PT205 und AT100) beider Altersgruppen. Die Streuungsbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an.

In den jüngeren Tieren stechen die beiden Regionen EC und Mo5 mit einem besonders hohen Anteil an TP-HP hervor. In den älteren Mäusen bestehen zwischen den unterschiedlichen Hirnarealen nicht mehr so große Unterschiede. Eine Abnahme der Gesamtneuronenzahl im Altersgang ist dabei nicht zu verzeichnen. Alle untersuchten Gebiete besitzen einen TP-Anteil in den Zellen zwischen ca. 5,7% und 8,7%. Die drei motorischen Gebiete NR-m, SN-r und Mo5 weisen hierbei die größten Prozentsätze auf.

Mit genauerer Betrachtung der einzelnen untersuchten Regionen zeichnen sich zum Teil

deutliche Differenzen in der Ausprägung der TP-HP und NFT-Bildung zwischen beiden Altersgruppen ab. Die stärkste Zunahme zeigt sich im NR-m und in der SN-r. Im PSC verdoppelt sich die Anzahl der TP-Ablagerungen. Mit einer Zunahme im Hipp um rund 1% bzw. einer Differenz von 0,2% im Mo5 sind in diesen Hirnarealen kaum altersspezifische Unterschiede in der Tau-Verteilung auszumachen. Aufgrund einer starken Ausprägung des TP im EC einer der drei Monate alten P301-Maus zeigt sich hingegen eine recht deutliche Abnahme in Abbildung 3-2.

Werden Pretangle-Strukturen, d.h. TP-Hyperphosphorylierungen und -Aggregationen, getrennt von den NFT betrachtet, so ist festzustellen, dass die Alterationen des TP in den jungen Mäusen ausschließlich aus hyperphosphoryliertem TP bestehen. Dagegen sind in den älteren Tieren auch Formationen von NFT zu finden. Diese bilden einen Anteil von knapp 5% aller TP-Veränderungen der achteinhalb-monatigen P301L-Mäuse, wobei besonders der Mo5 und der NR-m mit ca. 34% und 25% aller TP-Ablagerungen von NFT betroffen sind.

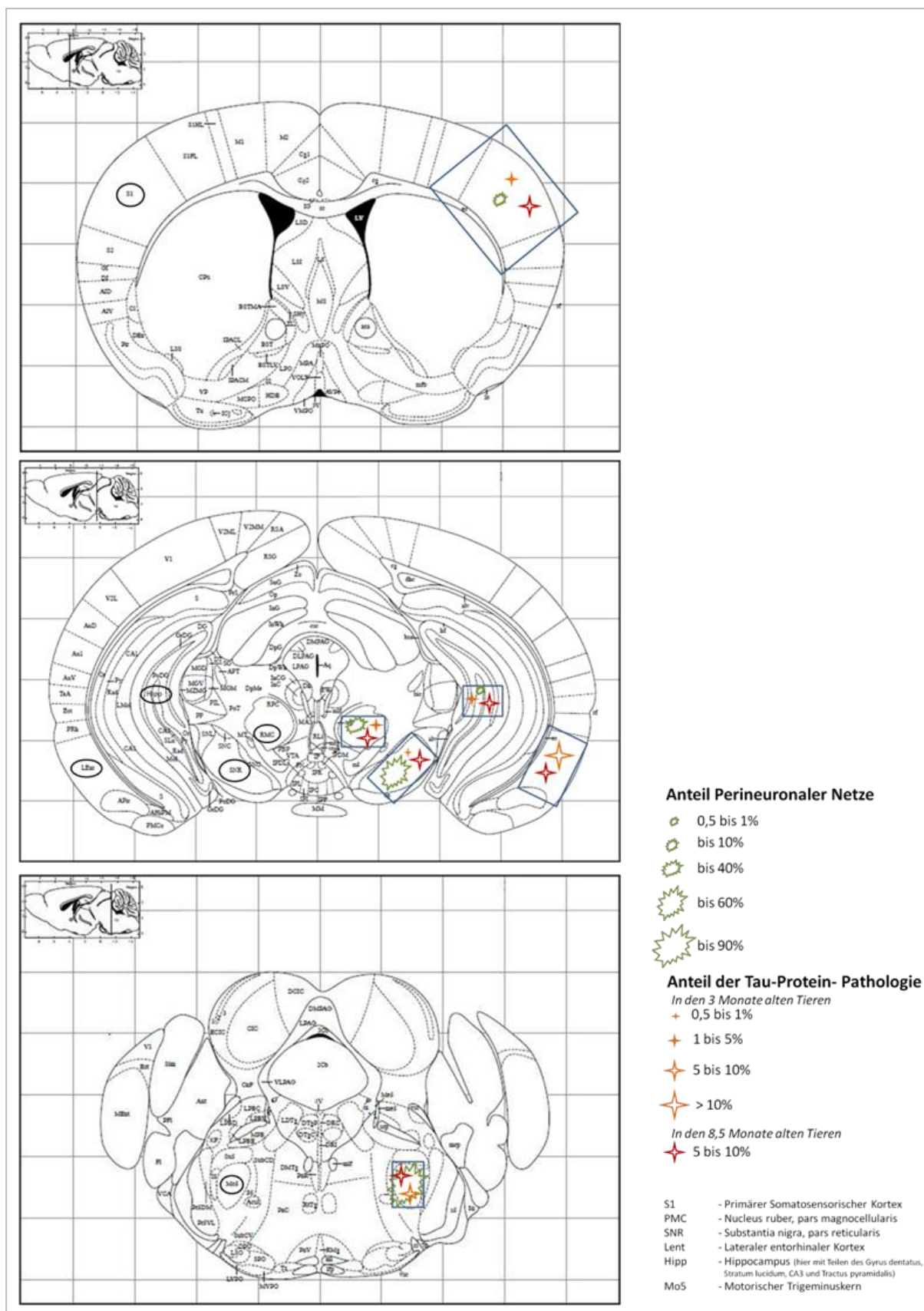


Abb. 3-3 Bearbeitete Schnittebenen der untersuchten Regionen (blau eingerahmt) mit Einzeichnung der Anteile netztragender Neurone sowie der Neurone mit Tau-Pathologien. Modifiziert aus (Franklin, Paxinos 2001)

3.3 Korrelation von Tau-Protein-Veränderungen und Perineuronalen Netzen im Mausmodell

Bezugnehmend auf die oben dargestellten Kontingenztafeln 3-1 und 3-2, in diesem Falle mit Fokus auf die Korrelation von PN und TP (rot markiert), ist festzustellen, dass in den drei Monate alten P301-Mäusen etwa 0,3% aller gezählten Neurone sowohl ein PN als auch TP-HP besitzen. In den älteren, achteinhalb Monate alten Tieren besitzen etwa 1,1% HP und NFTs. Folglich hat sich diese Schnittmenge beider Merkmale mehr als verdreifacht.

Um die Zielstellung der Arbeit zu bearbeiten, ist es notwendig, die TP-Ablagerungen in den netztragenden Neuronen getrennt von der Population nicht-netztragender Neuronen zu betrachten und davon ausgehend die jeweiligen Ausprägungen der TP-Veränderungen.

Zunächst regionsübergreifend, sind in Abbildung 3-4 die Anteile von HP und NFT zum einen von allen PN-freien Neuronen (links) und zum anderen von allen Neuronen mit PN (rechts) dargestellt, jeweils nach Alter der P301-Mäuse getrennt.

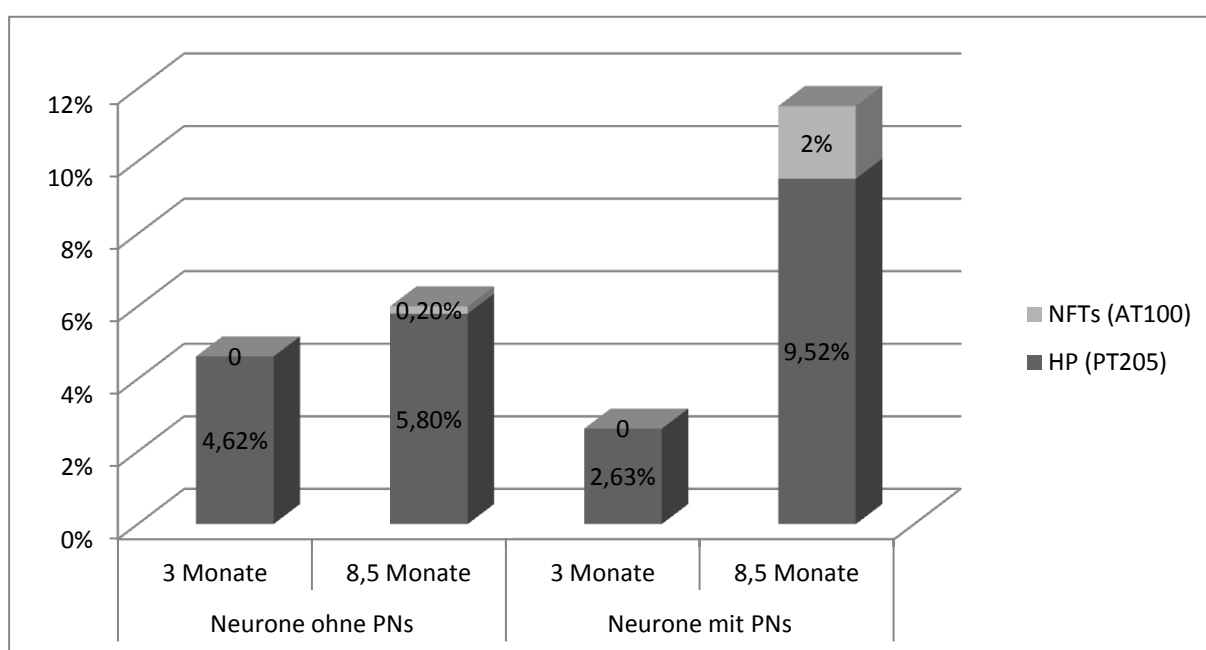


Abb.3-4 Population der TP- HP und NFTs unter nicht-netztragenden und netztragenden Neuronen

In den jüngeren Tieren überwiegt der prozentuale Anteil der TP-Veränderungen in den netzfreen Neuronen: 4,6% der Zellen ohne PN besitzen Ablagerungen des Tau-Proteins. Hingegen sind es in den Zellen mit PN nur 2,6%. Jedoch verändern sich die Anteile in der älteren Generation der Tiere: Hier zeigen die netztragenden Zellen mit etwa 11,5% deutlich mehr TP-HP bzw. NFT als die netzfreen Zellen mit rund 5,9%. Eine Abnahme der Gesamtneuronenzahl mit zunehmendem Alter kann nicht festgestellt werden.

3.4 Spezielle Betrachtung der untersuchten Hirnregionen

3.4.1 Primärer somatosensorischer Kortex

In der Region des primären somatosensorischen Kortex (PSC) tragen etwa 7% aller Neuronen ein PN. Durchschnittlich weisen diese Zellen in den jungen P301L-Mäusen weniger HP des TP auf als die Neuronen ohne Netz. In den 8,5 Monate alten Tieren sind es jedoch die netztragenden Neuronen, die vermehrt HP aufweisen (siehe Abb.3-5).

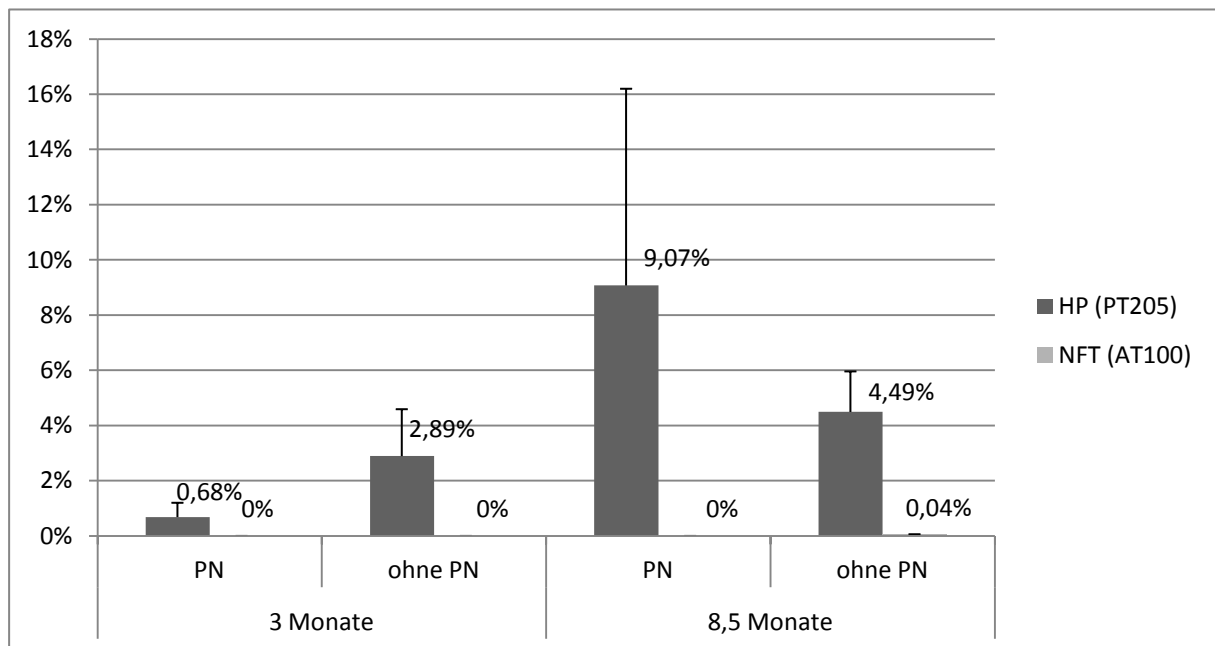


Abb. 3-5 Anteile der TP-Ablagerungen (HP und NFT) unter netztragenden und nicht-netztragenden Neuronen in beiden Altersgruppen im Primären somatosensorischen Kortex. Die Streuungsbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an.

Zur genaueren Betrachtung der ausgezählten Werte wurden die Odds Ratios (OR) sowie die Logits für jede Maus einzeln berechnet. Diese OR und Logits geben einen Hinweis auf die Ausprägung des Zusammenhangs zwischen netztragenden Neuronen und TP-Ablagerungen. Bei den OR deuten Werte über eins darauf hin, dass eine Korrelation zwischen beiden Merkmalen bestehen kann. Werte unter eins hingegen lassen vermuten, dass die netztragenden Neuronen im Gegensatz zu netzfreien Neuronen weniger pathologisches TP aufweisen. Nähern sich die Werte der eins an, so gibt es wahrscheinlich keinen Unterschied in der Ausprägung der Pathologie zwischen Neuronen mit und ohne PN. Bei den Logits weisen Werte über null auf eine erhöhte, Werte unter null auf eine geringere Anzahl von TP-HP in den Zellen mit PN hin – im Vergleich zu netzfreien Zellen.

Die errechneten Odds-Ratios im PSC betragen 0,34, 0,15 und 0,39. Hingegen zeichnet sich mit zunehmendem Alter der Tiere eine vermehrte Ausprägung in netztragenden Neuronen ab, mit

einhergehender Erhöhung der Chancenverhältnisse ($OR_1=0,43$; $OR_2=2,25$ und $OR_3=3,41$). Mit etwa 9% besitzen diese netztragenden Neuronen durchschnittlich sogar etwa doppelt so viele Hyperphosphorylierungen (HP) des TP als die Zellen ohne PN. Neurofibrilläre Tangles (NFT) wurden nur in der nicht-netztragenden Neuronenpopulation gefunden.

Tab. 3-4 Odds ratio und Logits der Hyperphosphorylierungen in netztragenden Neuronen des PSC

Maus	Odds ratio	Logit
P287	0,34	-1,08
P301	0,12	-2,12
P302	0,39	-0,94
P264	0,43	-0,84
P265	2,25	0,81
P266	3,41	1,23

3.4.2 Entorhinaler Kortex

Der Entorhinale Kortex (EC) ist ein Gebiet, in dem PN nahezu fehlen. Die wenigen Netze, die sich in diesem Gebiet immunhistochemisch darstellten, waren frei von TP-HP bzw. NFTs.

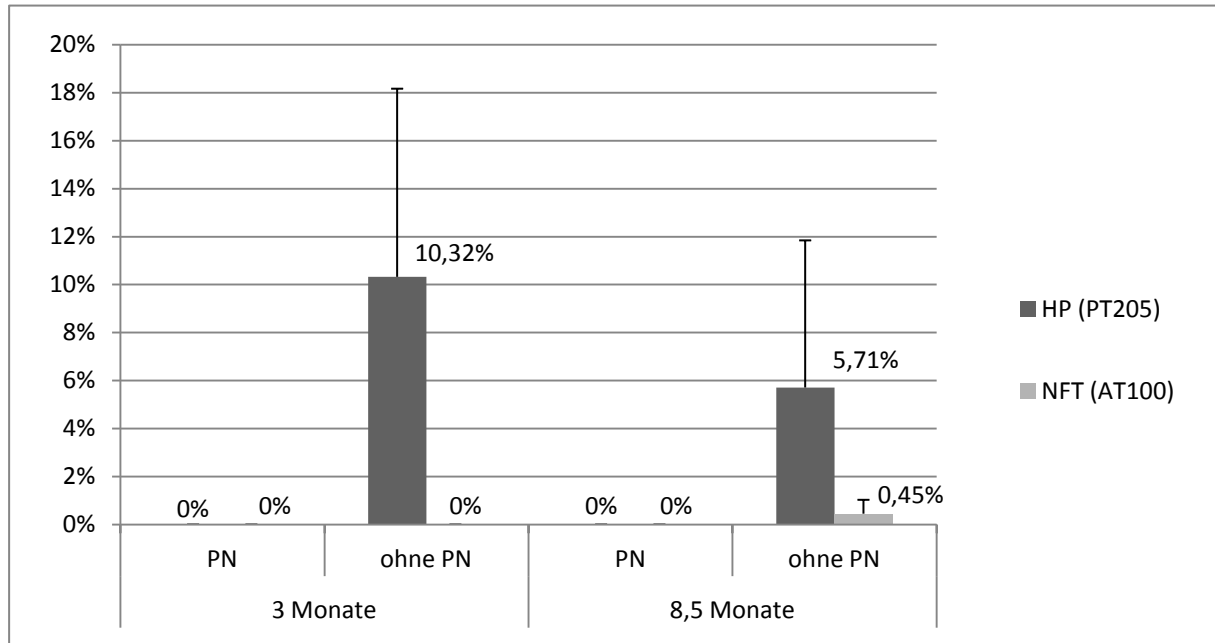


Abb. 3-6 Anteile der TP-Ablagerungen (HP und NFT) unter netztragenden und nicht-netztragenden Neuronen in beiden Altersgruppen im Entorhinalen Kortex. Die Streuungsbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an.

3.4.3 Hippocampus

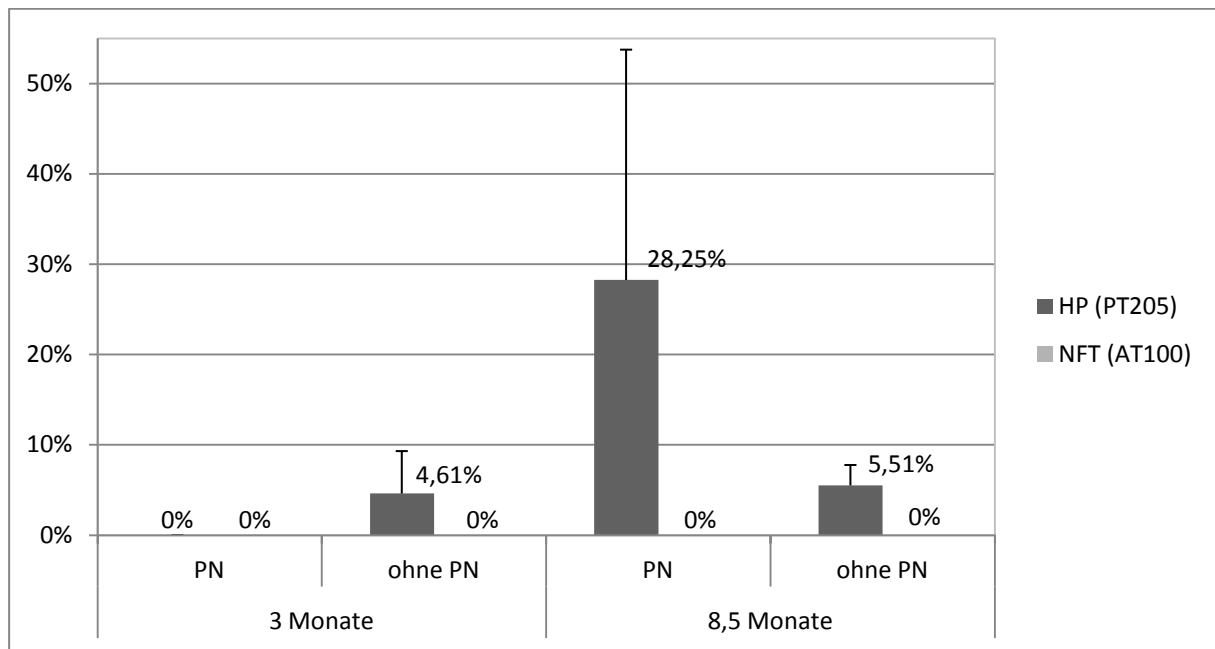


Abb. 3-7 Anteile der TP-Ablagerungen (HP und NFT) unter netztragenden und nicht-netztragenden Neuronen in beiden Altersgruppen im Hippocampus. Die Streuungsbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an.

Auch der Hippocampus (Hipp) besitzt in den hier ausgewerteten Bereichen weniger als 1% an Zellen, die von PN umschlossen sind. Wieder sind die netztragende Neurone der jungen Mäuse immunhistochemisch frei von TP-Veränderungen und nur die nicht-netztragenden Neurone weisen in den drei Monate alten Tieren ca. 4,6% HP auf. Zwischen den älteren Mäusen sind die Ausprägungen der TP-Pathologien inhomogen. Die netztragenden Neuronen der Maus P264 zeigen keine HP oder NFTs. In den Mäusen P265 und P266 betrugen die Anteile der HP allerdings 33% und 50%. Die Odds Ratios unterstreichen den vermehrten Befall der PN im Verhältnis zu den Neuronen ohne PN mit 16,3 und 14,9.

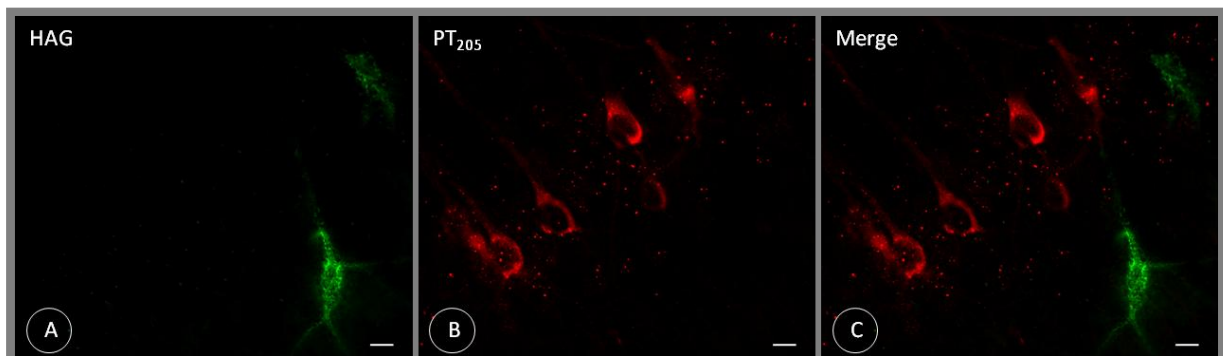


Abb. 3-8 Perineuronale Netze (A, HAG) und Hyperphosphorylierungen (B, PT205) im Gyrus dentatus des Hippocampus. Maßstab 10µm

3.4.4 Nucleus ruber, Pars magnocellularis

In beiden untersuchten Altersgruppen zeigen in der Pars magnocellularis des Nucleus ruber (NR-m) die Zellen mit PN einen größeren Anteil an hyperphosphoryliertem TP als die ohne PN. So besitzen die netztragenden Neuronen sowohl in den jüngeren als auch in den älteren Tieren durchschnittlich etwa 3,5-mal mehr TP-Ablagerungen. Allerdings ist dies in den Mäusen verschieden stark ausgeprägt, wie an den Odds ratios und Logits in der Tabelle 3-4 ersichtlich ist. Die NFT, die auch hier nur in den achteinhalb Monate alten Mäusen immunhistochemisch nachweisbar waren, fanden sich überwiegend in den netztragenden Neuronen.

Tab. 3-5 Odds ratio und Logits der Hyperphosphorylierungen in netztragenden Neuronen des NR-m

Maus	Odds ratio	Logit
P287	2,48	0,91
P301	0,73	-0,31
P302	10,4	2,34
P264	16,02	2,77
P265	7,96	2,07
P266	1,03	0,03

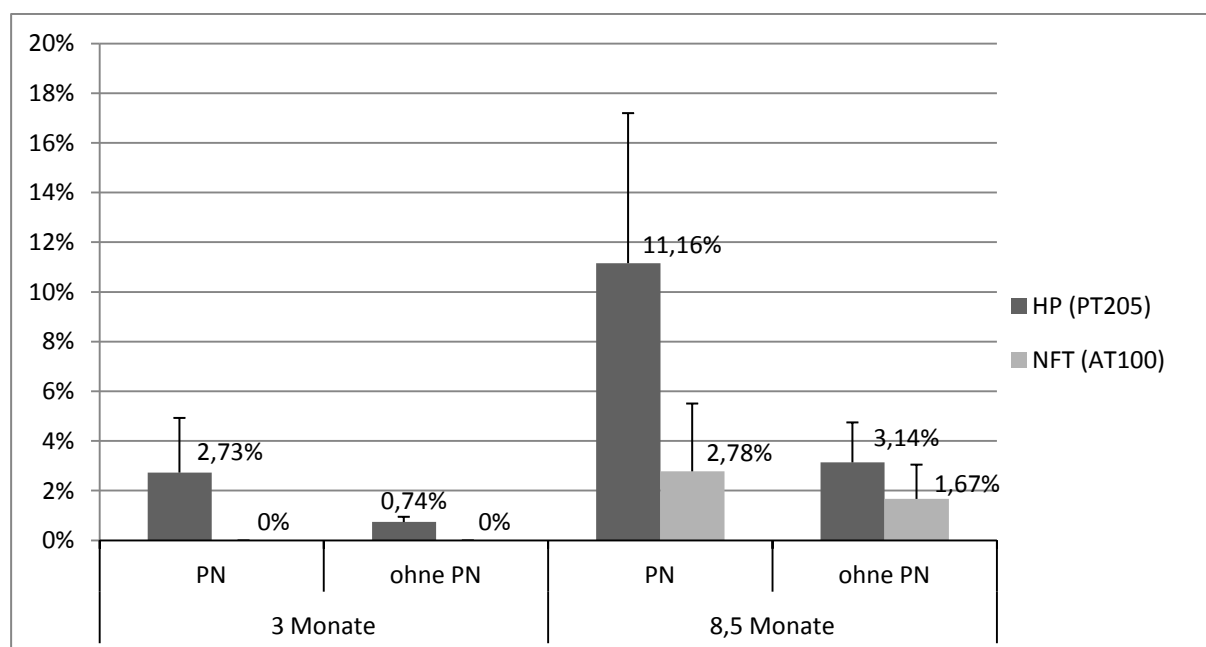


Abb. 3-9 Anteile der TP-Ablagerungen (HP und NFT) unter netztragenden und nicht-netztragenden Neuronen in beiden Altersgruppen im Nucleus ruber (Pars magnocellularis). Die Streuungsbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an.

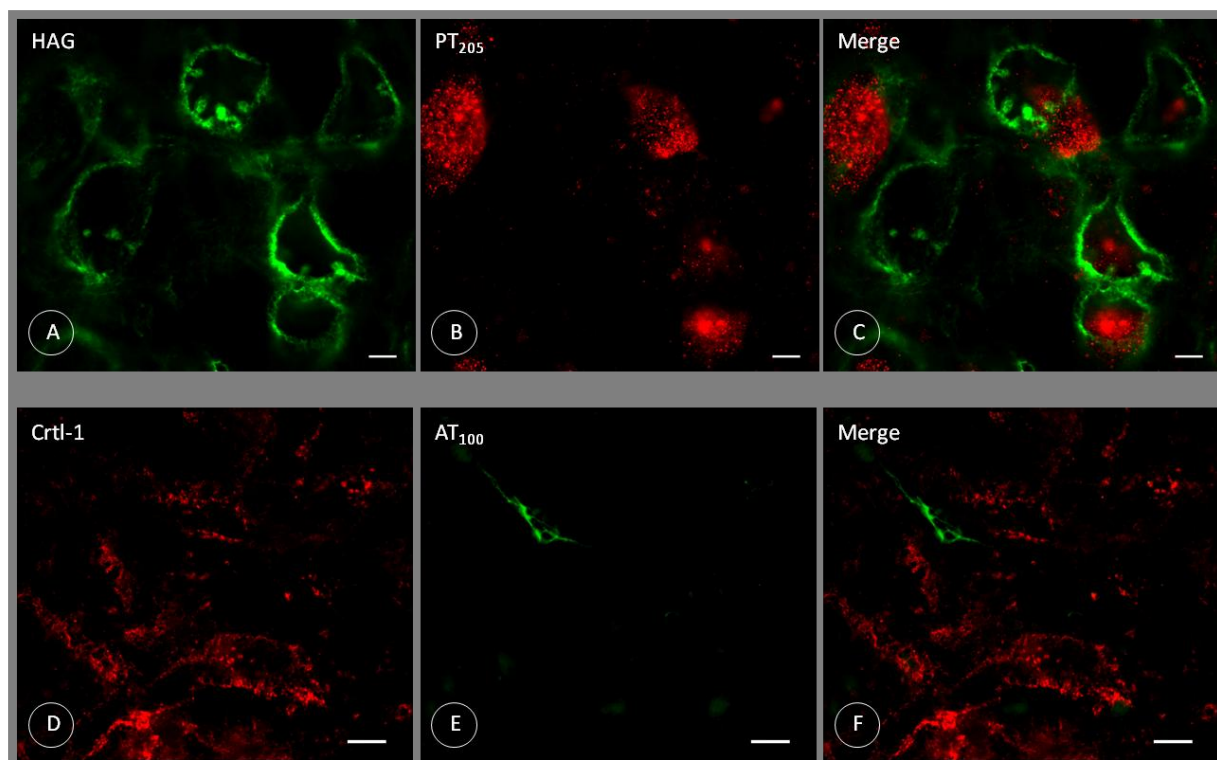


Abb. 3-10 Nucleus ruber (Pars magnocellularis) A-C: Perineuronale Netze (A, HAG) und Hyperphosphorylierungen (B, PT₂₀₅), B-C: Perineuronale Netze (D, Crtl-1) und Neurofibrilläres Tangle (E, AT₁₀₀), Maßstab 10µm

3.4.5 Substantia nigra, Pars reticulata

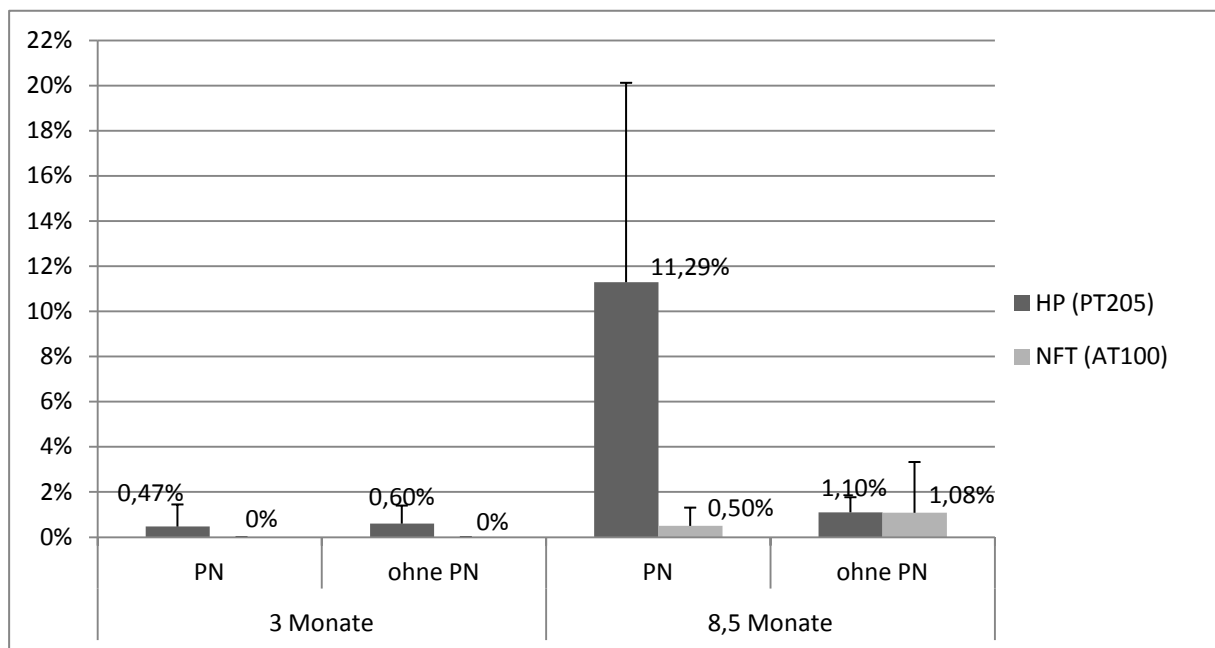


Abb. 3-11 Anteile der TP-Ablagerungen (HP und NFT) unter netztragenden und nicht-netztragenden Neuronen in beiden Altersgruppen in der Substantia nigra (Pars reticulata). Die Streuungsbalken geben je die jeweiligen Standardabweichungen an.

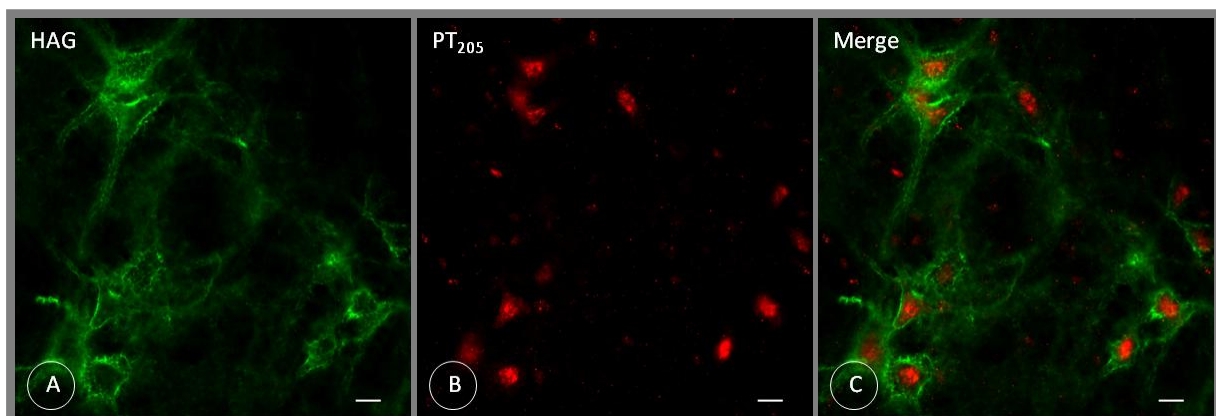


Abb. 3-12 Perineuronale Netze (A, HAG) und Hyperphosphorylierungen (B, PT205) in der Pars reticulata der Substantia nigra, Maßstab 10μm

In zwei der jungen Mäuse wurden in der Pars reticulata der Substantia nigra (SN-r) keine hyperphosphorylierten TP-Ablagerungen gefunden. In der dritten Maus wurden zwar HP des TP festgestellt, jedoch gab es keinen deutlichen Unterschied bezüglich deren Verteilung in netztragenden und netzfreien Zellen. In den älteren P301L-Tieren aber werden die Ungleichheiten deutlich: In zwei der achteinhalb Monate alten Mäuse wurden die HP ausschließlich in netztragenden Neuronen gefunden. Bei der dritten Maus beträgt das errechnete Chancenverhältnis 4,9, das auf eine fast fünf-fach höhere Wahrscheinlichkeit der Vorkommen der TP-HP in den Netzneuronen als in den netzfreien Neuronen hinweist. Im Mittel

konnten in mehr als 11% der Neuronen mit PN Ablagerungen des TP entdeckt werden, die netzfreien Neurone zeigten diese Veränderungen nur in etwa 1%. Die NFT hingegen traten, falls vorhanden, zum größeren Teil in Zellen ohne PN auf ($OR_{P265} = 0,35$; $Logit_{P265} = -1,04$).

3.4.6 Motorischer Trigemuskern

Auch im Motorischen Trigemuskern (Mo5) sind die netztragenden Neuronen die Zellen, die im Durchschnitt vermehrt von HP des TP betroffen sind, sowohl in den drei Monate als auch in den achteinhalb Monate alten Tieren. Es sind zwar zum Teil individuelle Schwankungen in der Ausprägung zu verzeichnen, jedoch besitzen die Zellen ohne PN durchschnittlich weniger Tau-Ablagerungen.

Für die NFT lässt sich kein eindeutiger Trend abzeichnen: Hier betragen die Logits der älteren Tiere 1,7, 0 und -1,2.

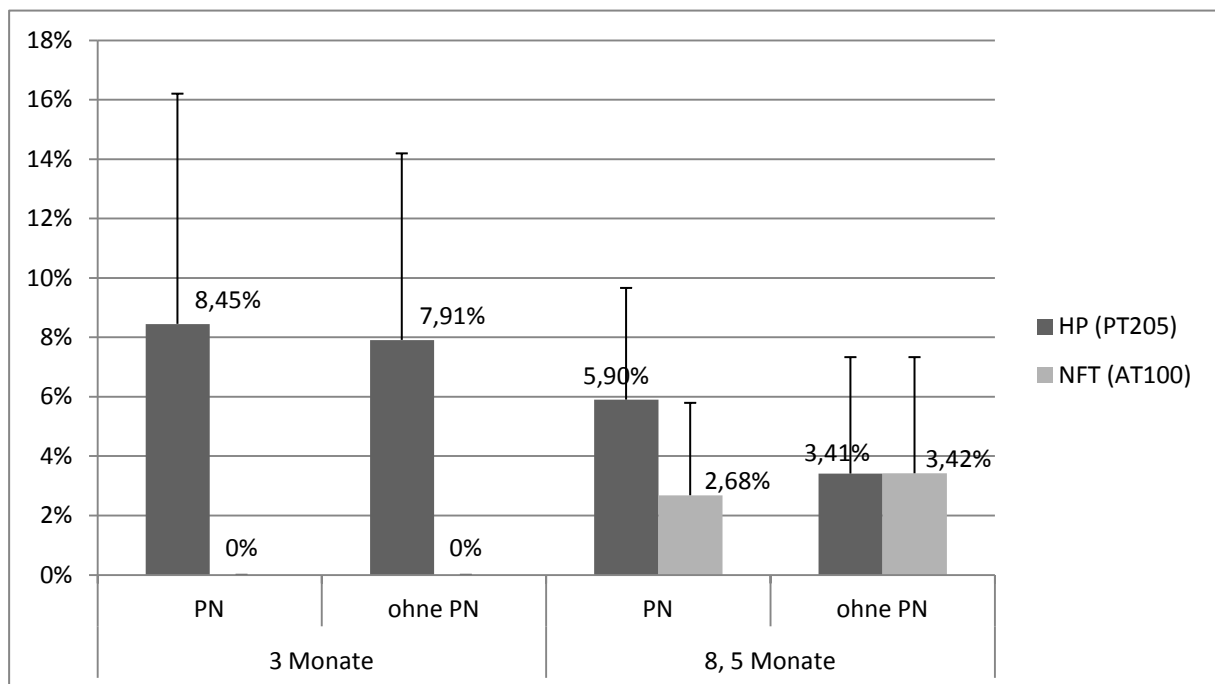


Abb. 3-13 Anteile der TP-Ablagerungen (HP und NFT) unter netztragenden und nicht- netztragenden Neuronen in beiden Altersgruppen im Motorischen Trigemuskern. Die Streuungsbalken geben die jeweiligen Standardabweichungen an

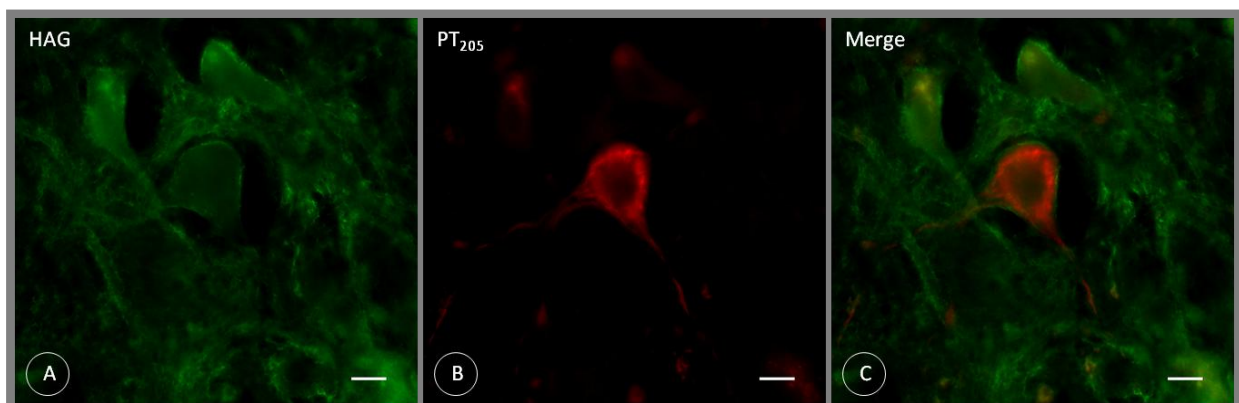


Abb. 3-14 Perineuronale Netze (A, HAG) und Hyperphosphorylierungen (B, PT205) im Motorischen Trigemuskern, Maßstab 10µm

3.5 Nachweis der Spezifität der verwendeten Antikörper am Western Blot

Um die Spezifität der verwendeten Antikörper (AK) zu überprüfen wurden Anti-Phosphotau-Thr205 (PT205), Anti-Phosphotau(Thr212/ Ser214)-100 (AT100) sowie Anti-Aggregan-core-protein (Acan/ Aggrecan) und Anti-humanes cartilage link protein1 (Crtl1) mittels Western Blot getestet (Abb.3-15). Untersucht wurden Proteinlysate von kortikalem Hirngewebe von zehn Monate alten männlichen Wildtyp (WT, Spur 1)-Mäusen sowie von weiblichen (Spur 2) und männlichen P301L-Mäusen (Spur 3).

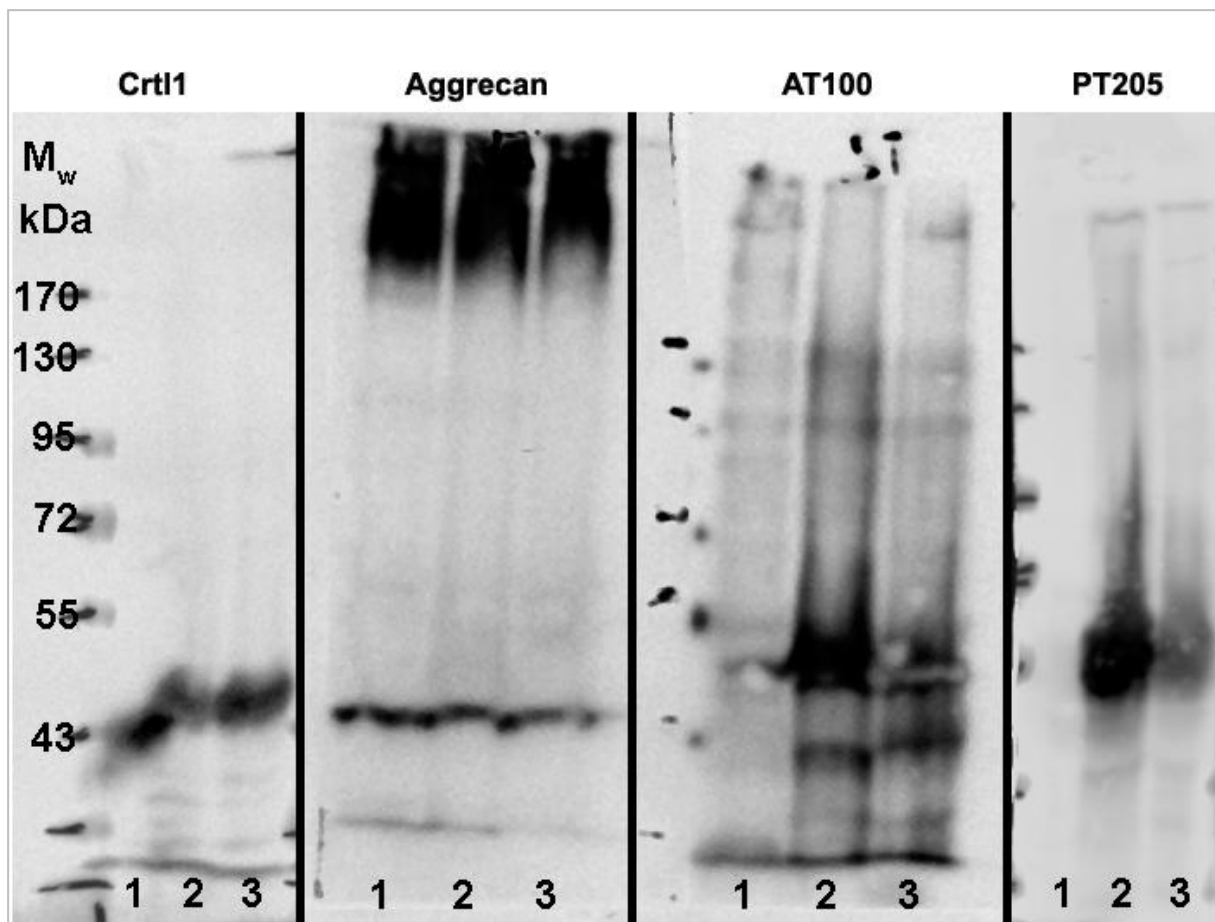


Abb. 3-15 Western Blot zum Nachweis von hyperphosphoryliertem und aggregiertem TP (PT205, AT100) sowie den PN-Bestandteilen Aggrecan und Crtl1 im kortikalen Hirngewebe von Wildtyp-(Spur°1), weiblichen P301L-(Spur°2) und männlichen P301L-(Spur°3) Mäusen.
Mw: Molekulargewicht in kDa

Bezugnehmend auf die Markierung der HP (PT205) und der NFT-Bildung (AT100) des TP ist in der Abbildung 3-15 zu erkennen, dass beide Antikörper je eine Bande in den P301L-Mäusen in Spur 2 und Spur 3 zwischen 43 und 55 kDa markieren. Auch ist zu erkennen, dass die weiblichen P301L-Tiere eine noch deutlichere Markierung als die männlichen P301L-Tiere aufweisen. Die WT-Maus in Spur 1 zeigt hingegen – genau wie in der immunhistochemischen Markierung – keine Färbung mit den beiden Antikörpern.

In der Darstellung des Aggrecans und des Link-Proteins (Crtl1) der PN zeigen sich keine Unterschiede zwischen den drei Mäusen. Die Banden sind annähernd identisch. Ein niedrigerer Gehalt der PN-Proteine in den P301L-Mäusen ist demnach im Western Blot nicht zu erkennen.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Untersuchung der möglichen protektiven Eigenschaften der Perineuronalen Netze (PN), gegenüber der Hyperphosphorylierung (HP) und Bildung Neurofibrillärer Tangles (NFT) des Tau Proteins (TP) in einem Mausmodell (P301L) der Frontotemporalen Demenz, wurden je drei Mäuse mit der P301L-Mutation im Alter von drei und achteinhalb Monaten immunhistochemisch untersucht. Des Weiteren wurden Western Blots durchgeführt um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu überprüfen.

Der Fokus lag hier auf der Betrachtung der netztragenden Neuronen hinsichtlich des Auftretens von TP-Veränderungen in Form von HP und NFT. Während sich in den jungen Mäusen nur HP darstellten, machten in den älteren Mäusen auch NFT mit etwa 5% einen Teil der TP-Veränderungen aus. In sechs Hirnregionen wurden die Neurone mit und ohne PN ausgezählt und bezüglich der intrazellulären Immunoreaktivität des Proteins in Kreuztabellen miteinander verglichen. Dabei sind zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Hirnregionen auffällig, besonders zwischen den eher PN-reichen, subkortikalen Gebieten (Pars reticulata der Substantia nigra (SN-r), Pars magnocellularis des Nucleus ruber (NR-m) und Motorischer Trigemuskern (Mo5)) und den PN-ärmeren, kortikalen Regionen (Somatosensorischer Kortex (SMC), Hippocampus (Hipp) und Entorhinaler Kortex (EC)).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass

- in den untersuchten **kortikalen** Gebieten der drei Monate alten Mäuse die netztragenden Neurone im Durchschnitt weniger hyperphosphoryliertes TP besitzen als die netzfreien Neurone. Dies scheint sich jedoch in den achteinhalb Monate alten Mäusen umzukehren, mit vermehrtem Nachweis der HP innerhalb der Zellen mit PN. Die errechneten Chancenverhältnisse und Logits zeigen eine deutliche Erhöhung. NFT stellten sich immunhistochemisch nur in Zellen ohne PN dar.
- in den netzreichen **subkortikalen** Regionen bereits junge Mäuse die TP-HP überwiegend in netztragenden Neuronen aufweisen. Mit zunehmendem Alter steigen auch die Chancenverhältnisse und Logits weiter an, die damit den vermehrten Nachweis des TP in netztragenden Zellen unterstreichen. Vorkommen von NFT in netztragenden Neuronen ließen sich auch darstellen: Im NR-m waren sie überwiegend in PN-Zellen zu finden, in der SN-r vorwiegend in netzfreien Zellen und der Mo5 zeigte große individuelle Schwankungen und lässt keine eindeutige Aussage darüber zu.

Des Weiteren kann unterstrichen werden, dass es keinen Hinweis auf eine signifikante Abnahme der PN in den transgenen P301L-Mäusen gibt, sowohl im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen als auch im fortgeschrittenen Alter. So kann vermutet werden, dass trotz HP und NFTs des TP in

netztragenden Zellen, die PN und die von ihnen umschlossenen Neurone in ihrer Anzahl nicht abnehmen.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Mausmodell P301L

Untersuchungen anhand von Tiermodellen sind gängige wissenschaftliche Methoden. Sie veranschaulichen physiologische, biochemische und/oder pathologische Prozesse und tragen wesentlich zum Verstehen komplexer Sachverhalte bei. Ihr Einsatz sollte jedoch jeweils kritisch abgewogen werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Mausmodelle besitzen einen hinsichtlich des Tau-Proteins (TP) veränderten Genotyp. Anstatt des Wildtyp(WT)-Maus-Tau-Gens exprimieren sie das humane Tau-Gen mit der P301L-Mutation. Als Promotor diente in diesem Model der Maus-Prion-Protein-Promotor (mPPP). Prion-Protein-Promotoren ermöglichen die Expression fremder Gene in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems. Bei dem mPPP findet eine erhöhte Expression der transgenen Proteine besonders in Herz und Gehirn statt (Borchelt et al. 1996). Lewis et al. beschrieben erstmals ein P301L-Maus-Modell mit dem mPPP, das große Vorkommen von Neuronen mit TP-Pathologien in Kortex (besonders im Piriformen und Entorhinalen Kortex), Hippocampus und den Basalganglien sowie von Neurofibrillären Tangles (NFT) in Dienzephalon, Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark aufwies (Lewis et al. 2000). Lin et al. beschrieben außerdem TP-Pathologie in Oligodendrozyten und Astrozyten (Lin et al. 2003). So hat dieses Mausmodell trotz des Promotor-bedingten Expressionsmusters große Übereinstimmungen mit den histopathologischen Charakteristiken der P301L-Mutation der Frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17).

Die untersuchten P301L-Mäuse haben einen homozygoten Genotyp, weshalb die Neurone ausschließlich das humane Gen und kein endogenes WT-TP exprimieren. Dies hat eine rasche Progredienz der Erkrankung zur Folge. Zudem ist bereits innerhalb weniger Monate eine deutliche Ausprägung des Phänotyps zu erkennen und Untersuchungen können frühzeitig vorgenommen werden. Aufgrund des homozygoten Genotyps findet sich vermutlich eine weitaus gravierendere Ausprägung des histopathologischen Befundes als bei an FTDP-17 erkrankten Menschen mit in der Regel heterozygoten Genotypen.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden einige Hirnschnitte der P301L-Mäuse mittels der Biotin-Avidin-Methode mit dem Antikörper (AK) Tau-1 markiert, um das Vorkommen des TP in allen Neuronen nachzuweisen. Diese Positivkontrolle zeigte eine regelmäßige Verteilung des TP sowohl in den netztragenden Neuronen als auch in den Neuronen ohne PN. Demnach konnten Fehlerquellen durch mögliche unterschiedliche Expressionsmuster des TP in den verschiedenen Zellen weitgehend ausgeschlossen werden.

In dieser Studie wurden, außer im Western Blot, nur weibliche Tiere untersucht, sodass geschlechtsspezifische Unterschiede ausgeschlossen werden können. Des Weiteren ist die Stichprobenzahl mit je drei P301L-Mäusen klein. Trotzdem können die Ergebnisse auf mögliche Korrelationen von PN und der P301L-Pathologie hinweisen.

4.1.2 Immunhistochemie und deren Auswertung

Die Auswahl der Hirnschnitte erfolgte anhand der Zielregionen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Dabei wurden je Gehirn drei benachbarte Hirnschnitte mit den genannten Gebieten ausgewählt, um die immunhistochemische Färbung von 1) Neuronen mittels NeuN, 2) HP und PN mittels PT205 und HAG und 3) NFT und PN mittels AT100 und Crt11/HAPLN1 durchzuführen. Aufgrund dieser Auswahl der Schnitte, der individuellen Unterschiede der Gehirne sowie der Untersuchung nur eines Hirnschnittes pro Region und Maus hinsichtlich der PN und TP-Ablagerungen, können geringfügige Abweichungen in den Schnittebenen zwischen den verschiedenen Mäusen auftreten. Da das Ziel der Arbeit jedoch darin bestand zu untersuchen, ob PN und hyperphosphoryliertes TP oder NFTs gemeinsam bei einem Neuron auftreten können, wurde diese Möglichkeit der Abweichung toleriert.

Die Fluoreszenz-Immunhistochemie ermöglicht eine visuelle Darstellung der untersuchten Parameter und eine deutliche Differenzierung von anderen Strukturen. Dank der Markierung mit den monoklonalen AK PT205 und AT100 konnten zwei Stadien der intrazellulären Aggregationen des TP visualisiert und quantitativ ausgewertet werden, HP und NFTs. Beide AK wurden bereits mehrfach in Studien eingesetzt. PT205 detektiert mit Threonin 205 allerdings nur eine von zahlreichen Phosphorylierungsstellen des TP, deren Hyperphosphorylierung lediglich eine reversible Vorstufe der TP-Pathologie darstellt. AT100 hingegen markiert wahrscheinlich aggregiertes TP (Augustinack et al. 2002; Alonso et al. 2001; Gärtner et al. 1998, Matsuo et al. 1994; Morawski et al. 2010b; Morawski et al. 2010a; Morawski et al. 2012b). In fortführenden Untersuchungen kann über einen erweiterten Einsatz von AK nachgedacht werden, die die Markierung weiterer Phosphorylierungsstellen des Tau-Proteins ermöglichen. Auch die übrigen monoklonalen AK (HAG, Crt11 sowie NeuN) dienten in Untersuchungen wiederholt dem Nachweis von PN sowie Neuronen (Carulli, Rhodes, Fawcett 2007; Brückner et al. 2008; Carulli et al. 2010; Morawski et al. 2010b; Morawski et al. 2010a).

Ein großer Vorteil der Immunhistochemie ist die gemeinsame Darstellung zweier, miteinander zu vergleichender Proteine bzw. Strukturen. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M und dem dazugehörigen Computerprogramm Axiovision 4.6. Mit Hilfe der Übersichtsaufnahmen der Hirnschnitte wurden die Parameter ausgezählt. Aufgrund der gewählten Dicke der Hirnschnitte von 30µm, die für die Erhaltung dergleichen während der Färbeprozesse nötig war, überlagern sich mehrere Zellschichten. Dies erforderte mehrmaliges

Fokussieren sowie Änderungen der Belichtung und stellt eine mögliche Fehlerquelle dar, bezüglich denkbarer Ungenauigkeiten der ausgezählten Werte.

4.1.3 Western Blot

1979 entwickelt, ist der Western Blot eine bis heute etablierte Methode, Proteine biochemisch aufzutrennen und anschließend visuell darzustellen (Renart, Reiser, Stark 1979; Burnette 1981). Die Herstellung eines Gewebe-Homogenisats ist dabei einer der ersten Schritte in der Durchführung des Western Blots und für mögliche Änderungen der Konzentrationen der darzustellenden Proteine verantwortlich. Aufgrund der Homogenisierung des Hirngewebes sind viele verschiedene Bestandteile – auch nicht neuronalen Ursprungs – im Lysat enthalten: Neuronen, Gliazellen, Extrazelluläre Matrix, Blutgefäße, Endothelzellen unter anderem. Da jedoch nur isoliert kortikales Hirngewebe verwendet wurde und lediglich die Darstellung von Aggrekan, dem Link-Protein und dem Tau-Protein erwünscht war, sollten die übrigen Gewebeanteile keine bedeutende Fehlerquelle bei diesem Proteinnachweis darstellen. Auch ist diese Nachweismethode von den verwendeten AK abhängig. Die Diskussion der hier genutzten AK erfolgte bereits in der Diskussion der Immunhistochemie (Siehe 4.1.2).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 TP-Pathologie der FTDP-17 des Menschen und der P301L-Maus

Die Rekrutierung und postmortale Untersuchung menschlichen Hirngewebes bei Patienten mit FTDP-17 gestaltet sich aufgrund der relativ geringen Prävalenz und der rechtlichen Bestimmungen in Deutschland als schwierig. Die Untersuchung der Erkrankung am Tiermodell ist eine dienliche Alternative. So wurden in dieser Arbeit transgene Mäuse mit der P301L-Mutation untersucht, die homozygot ausschließlich humanes TP exprimieren. Sie weisen eine schnelle Progression der Erkrankung auf: Bereits nach drei Monaten sind in durchschnittlich 4,4% und nach etwa achteinhalb Monaten 6,1% der Neuronen Veränderungen des TP mikroskopisch zu erkennen. Hinzu kommen die intrazellulären Ablagerungen in Form von NFTs in den älteren Tieren. Makroskopisch ist eine deutliche Größendifferenz des Gehirns zwischen den Wildtyp-Tieren und denen mit der P301L-Mutation in beiden Altersgruppen zu sehen.

Die FTDP-17 des Menschen ist geprägt durch eine Atrophie des Kortex in Frontal- und Temporallappen oft auch unter Beteiligung des limbischen Systems und der Basalganglien mit Substantia nigra (Spillantini et al. 1998; Bird et al. 1999; Kumar-Singh, van Broeckhoven 2007). Histopathologisch ist die Erkrankung durch TP-positive Einschlüsse -in Form von Hyperphosphorylierungen (HP), Aggregationen und später NFTs-in Zellsomata und -Fortsätzen von Neuronen und Gliazellen der genannten Hirnareale charakterisiert (Seilhean et al. 2011). Genauso stellt in den untersuchten P301L-Mäusen die immunhistochemische Färbung der HP und NFTs sowohl Zellkörper als auch deren Fortsätze deutlich dar.

Sowohl beim Menschen als auch in den transgenen Tieren variiert der Anteil der Tauopathologie in den Neuronen sehr stark zwischen den Hirnregionen. Es ist bekannt, dass auch ohne Tauopathie das TP in unterschiedlichen Mengen in den verschiedenen Hirnabschnitten vorkommt (Holzer et al. 1994). So sind in gesunden Personen beispielsweise die Regionen des Limbischen Systems (Hippocampus, Entorhinaler Kortex etc.) reich an TP-Isoformen. Vermutet wird, dass diese Strukturen aufgrund ihrer Funktion im Bereich der Gedächtnisbildung eine erhöhte neuronale Plastizität benötigen und das TP dafür von Wichtigkeit ist. Da jene Hirnbereiche jedoch auch einen großen Anteil dieses Proteins besitzen, sind sie deshalb wohlmöglich vulnerabler im Falle einer Tauopathie. Der PSC besitzt im Vergleich dazu einen geringeren Gehalt an TP und scheint weniger anfällig gegenüber TP-Pathologie zu sein (Holzer et al. 1994). Desweiteren sind Hirnregion-spezifische Unterschiede – die TP-Phosphorylierung betreffend – bekannt, die zu den regionalen, pathologischen und klinischen Ungleichheiten beitragen können (Kremer et al. 2011).

Auch in dieser Arbeit fallen der EC und der Hipp durch ihre ausgeprägte Histopathologie bereits bei den drei Monate alten P301L-Mäusen auf. Hingegen waren in diesen Gebieten kaum NFTs

vorhanden. In den älteren Mäusen sind die Ablagerungen besonders in den motorischen Kerngebieten SN-r, NR-m und Mo5 ausgeprägt und es ist wahrscheinlich, dass diese für die späteren motorischen Defizite mitverantwortlich sind. Zudem ist es möglich, dass diese starken Ausprägungen der TP-Veränderungen in den genannten Regionen dem Maus-Prion-Protein-Promotor der transgenen Mäuse geschuldet sind.

In Untersuchungen von Overk et al. an transgenen Mäusen mit einem Thy1.2-Promotor wurden jedoch ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit festgestellt: Untersucht wurden je drei dreifach-transgene Mäuse mit Mutationen des Amyloid-Precursor-Protein-Gens (APP_{Swe}), des Presenilin-1-Gens ($PS1_{M146V}$) sowie des P301L-Gens im Alter von zwei und zwölf Monaten. Sie beobachteten mit Hilfe des AK Anti-Tau-8 ausgeprägte histopathologische Befunde in der Substantia nigra, dem Nucleus ruber und dem Motorischen Trigeminskern (Overk et al. 2009).

Nicht nur zwischen den verschiedenen Hirnarealen existieren Unterschiede in den histopathologischen Merkmalen der P301L-Mutation. Auch zwischen den einzelnen Tieren gibt es zum Teil starke Schwankungen, die eine adäquate Auswertung der Ergebnisse erschweren. Jedoch sind auch beim Menschen sowohl zwischen als auch innerhalb von Familien mit der P301L-Mutation klare phänotypische Unterschiede beschrieben (Bird et al. 1999; D'Souza et al. 2005).

Die P301L-Mutation hat demgemäß auch beim Menschen kein klar umschriebenes Erscheinungsbild zur Folge. Dies lässt vermuten, dass außerhalb des Genotyps noch weitere Faktoren – beispielsweise genetisch und/oder durch Umwelteinflüsse – die Art und Ausprägung des Phänotyps beeinflussen.

4.2.2 Perineuronale Netze und Tau-Protein-Veränderungen

Es kann festgehalten werden, dass in dieser Forschungsarbeit netztragende Neuronen mit dem histopathologischen Merkmal der P301L-Mutation in Form von hyperphosphoryliertem TP beobachtet wurden.

Dass die Anzahl der PN-Zellen mit hyperphosphoryliertem und aggregiertem TP mit fortgeschrittenem Alter der Mäuse mehr als dreifach zunimmt, kann mit der starken Progression der Erkrankung erklärt werden. Besonders da aufgrund des homozygoten Genotyps eine gravierendere Ausprägung des Phänotyps zu vermuten ist. Auch kann dies eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in den drei Monate alten Tieren die HP in den netzfreien Neuronen vorherrschen, während hingegen diese und die NFT in den acht Monate alten Tieren überwiegend in Neuronen mit PN vorzufinden sind.

4.2.2.1 Perineuronale Netze und Tau-Protein-Hyperphosphorylierungen

Der Hippocampus (Hipp) und der Entorhinale Kortex (EC), als Teile der Hippocampusformation und des limbischen Systems, befinden sich zum größten Teil im medialen Temporallappen des Gehirns. Es ist bekannt, dass diese Strukturen bei der FTDP-17 mit in Mitleidenschaft gezogen werden (Spillantini et al. 1998; Bird et al. 1999; Kumar-Singh, van Broeckhoven 2007; Kremer et al. 2011). So war es hier von Interesse, das Verhältnis zwischen Neuronen mit PN und TP-Ablagerungen in diesen Gebieten zu untersuchen. Beide Regionen besitzen in der Maus, im Vergleich zu anderen Hirngebieten, nur eine geringe Anzahl PN. In dieser Arbeit wurden weniger als ein Prozent aller Neurone in den ausgezählten Bereichen als netztragende Zellen ermittelt. Im EC zeigten sich in allen sechs transgenen Tieren keine netztragenden Neurone mit hyperphosphoryliertem TP, trotz deutlicher Ausprägung von HP. Auch im Hipp der jungen Mäuse konnte kein gleichzeitiges Auftreten beider Faktoren beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Auszählungen im Hipp der acht Monate alten Mäuse fallen sehr unterschiedlich aus. Aufgrund der geringen PN-Dichte ändern sich, bei Auftreten eines netztragenden Neurons mit hyperphosphoryliertem TP, die prozentualen Anteile und deren Interpretation deutlich. Es entstehen somit Unsicherheiten, die bei Betrachtung dieser beiden Regionen keine überzeugenden Schlussfolgerungen über die Korrelation von PN und TP-Veränderungen zulassen. Dafür wäre in einer Folgestudie eine größere Stichprobenzahl notwendig.

Die motorischen Kerngebiete, Pars magnocellularis des Nucleus ruber (NR-m), Pars reticulata der Substantia nigra (SN-r) und der motorische Trigemuskern (Mo5), haben eine hohe Dichte an PN gemeinsam. In diesen Kerngebieten wurden viele netztragende Neuronen mit hyperphosphoryliertem und aggregiertem TP beobachtet, sodass in dieser Forschungsarbeit nicht davon ausgegangen werden kann, dass in der Erkrankung der FTDP-17 mit der Mutation P301L die Neuronen der PN eine geringere Vulnerabilität gegenüber der TP-Veränderungen aufweisen als die Neuronen, die nicht von einem PN umschlossen sind.

4.2.2.2 Perineuronale Netze und Neurofibrilläre Tangles

Für das Auftreten von NFTs in Zellen mit oder ohne PN kann keine eindeutige Tendenz ausgemacht werden. Die NFT im Bereich des Primären Somatosensorischen Kortex (PSC) finden sich ausschließlich in netzfreien Neuronen, während sie in SN-r, NR-m und Mo5 sowohl in netztragenden, als auch in Neuronen ohne PN vorkommen.

Wieder ist es möglich, dass die Ungleichheiten zwischen den Regionen der unterschiedlichen Hirnareal-abhängigen Phosphorylierung des TP geschuldet sind, die mitverantwortlich für die vielfältigen Krankheitsausprägung sein kann (Kremer et al. 2011). Brückner et al. beschreiben zudem, dass es, wenn auch sehr vereinzelt, PN-assoziierte Neuronen in der Pathologie der

Alzheimerschen Erkrankung gibt, die intrazelluläre NFT-Ablagerungen aufweisen, jedoch ohne, dass die PN dabei zerstört werden. Jene mögliche Widerstandsfähigkeit netztragender Zellen gegenüber NFTs und Zell-Degeneration wurden in verschiedenen Studien beschrieben (Schüppel et al. 2002, Morawski et al. 2010a, Morawski et al. 2012b, Lendvai et al. 2013).

Jedoch ist die Rolle der NFT in der Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankungen noch nicht sicher aufgeklärt. Fest steht, dass die TP-Hyperphosphorylierungen ein Vorstadium der TP-Aggregation darstellt. Doch ob die NFT toxischer Natur sind, oder eine Form von Schutzmechanismus der Zellen vor weiterer Schädigung, wird bis heute diskutiert (Santa Cruz et al. 2005; Gomez-Isla et al. 1997; Alonso et al. 2006; Ballatore et al. 2007).

Die Arbeitsgruppe um Teresa Gomez-Isla stellte bei der Untersuchung von Hirngewebe von Alzheimer-Patienten fest, dass die Anzahl der NFT zwar mit dem Verlust von Neuronen und dem Fortschreiten der Demenz ansteigt, jedoch übersteigt der Zelluntergang im Verhältnis mehrfach die NFT-Ausprägung. Auch Karen Santa Cruz und ihre Kollegen beobachteten in einem Mausmodell mit P301L-Mäusen, dessen TP durch die Gabe von Doxycyclin unterdrückt werden kann, dass trotz Innehaltens des Zelluntergangs die Anzahl der NFT weiterhin anstieg. So ist es möglich, dass der neuronale Verlust durch andere Mechanismen als durch NFTs verursacht wird (Gomez-Isla et al. 1997; Santa Cruz et al. 2005).

Im Falle ihrer Funktion als Schutzmechanismus könnten NFTs in Verbindung mit den PN ein zusätzlicher Weg sein, das betroffene Neuron zu erhalten. So würden die hohen TP-HP und die dagegen nur sehr wenig vorkommenden NFTs (im Hipp gar nicht und im EC <0,45%) bei der geringen PN-Dichte diese Theorie unterstützen. Doch auch im Falle eines gemeinsamen Auftretens von PN und NFTs bei einem Neuron ist nicht zwangsläufig widerlegt, das PN vor dem Zelluntergang aufgrund von TP-Pathologie schützen. Solange ein Netz vorhanden ist, existiert das von ihm umgebene Neuron. PN und Zelle stehen miteinander in Wechselwirkung: Die Zellen stellen das für die PN notwendige Link-Protein HAPLN-1 und Hyaluronsäure bereit (Carulli et al. 2006). Außerdem ist die membranständige Hyaluronsäuresynthase der Neuronen neben der Hyaluronsynthese auch für die Befestigung der Hyaluronsäure, und folglich auch des Netzes, an die Zelle verantwortlich (Kwok et al. 2010).

Wie bereits festgestellt beobachteten Brückner et al. und Morawski et al. ebenso in ihren Untersuchungen zur Pathologie der Alzheimer Erkrankung sehr vereinzelt netztragende Neurone mit NFT, ohne dass diese dabei zerstört wurden (Brückner et al. 1999; Morawski et al. 2010a). Von Interesse wäre es deshalb, die neuronale Aktivität der von TP-Pathologie betroffenen Zellen in der P301L-Maus zu untersuchen. Wären die Funktionen der netztragenden Neuronen im Vergleich zu nicht-netztragenden Neuronen bei intrazellulärer TP-Pathologie noch erhalten, so ließe sich eine verlässlichere Aussage zur möglichen neuroprotektiven Eigenschaft der PN machen. Dies könnte Gegenstand einer weiteren Forschungsarbeit sein.

4.2.3 Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus auf Chromosom 17 versus Alzheimersche Erkrankung

Der Unterschied dieser Arbeit zu vorangegangenen Untersuchungen der Perineuronalen Netze ist, dass das gemeinsame Auftreten von PN und intrazellulärem, hyperphosphoryliertem TP in den P301L-Mäusen keine Seltenheit ist. Es ist zu überlegen, ob dies mit den Unterschieden der Frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus auf Chromosom 17 (FTDP-17) zur Alzheimer-Pathologie begründet werden kann. Welchen Grund kann es für die so deutliche Abgrenzung der P301L-FTDP-17 von der Alzheimerschen Erkrankung (AD) in Bezug auf die PN geben?

Auch in der Pathologie der AD spielt das TP eine wesentliche Rolle. Jedoch ist AD keine reine Tauopathie. Neben den intrazellulären NFT aus abnormal hyperphosphoryliertem TP ist ein weiteres wesentliches histopathologisches Merkmal bekannt: Extrazelluläre senile Plaques aus β -Amyloid (Tolnay, Probst 2003). Während die β -Amyloid-Ablagerungen im Neokortex beginnen und anschließend auf Allokortex- und Subkortex-Regionen übergehen, treten die TP-Ablagerungen zuerst in Entorhinalen Kortex und Limbischen Strukturen auf und breiten sich anschließend auf die verbundenen Neokortex-Gebiete aus (Zusammenfassend erläutert in Jucker, Walker 2011). Es gibt Hinweise darauf, dass das β -Amyloid die Bildung der NFT erhöht und somit einen bedeutender Pathogenitätsfaktor und Trigger für die Tauopathie und die vermutlich darauffolgenden kognitiven Dysfunktionen darstellt (Götz et al. 2001; Tolnay, Probst 2003; Tackenberg, Brandt 2009). Tackenberg et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass Schnittkulturen von Wildtyp(WT)-Mäusen, die mit β -Amyloid versetzt worden sind, eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung des TP aufweisen. Des Weiteren wurden Schnittkulturen von Mäusen mit der P301L-Mutation sowie der R406W-Mutation (einer weiteren TP -Mutation, die zur FTDP-17 führt) mit β -Amyloid versetzt. In beiden wurden keine Veränderungen des Phosphorylierungsgrades des TP entdeckt. Das lässt vermuten, dass β -Amyloid die Phosphorylierung von WT-TP und dem TP der FTDP-17 auf unterschiedlichem Wege beeinflusst (Tackenberg, Brandt 2009).

Ein weiterer Unterschied zwischen der AD und der FTDP-17 ist, dass der letztgenannten neurodegenerative Erkrankung eine autosomal dominant vererbte Mutation des TP zugrunde liegt. Das heißt, dass die P301L-Mutation im Erbgut bereits von Lebensbeginn an vorliegt und überwiegend im präsenilen Alter symptomatisch wird. Es gibt zwar familiäre Formen der AD, denen eine Mutation zugrunde liegt (im Amyloid-Precursor-Protein, Presenilin-1- oder Presenilin-2-Gen) und die zu den so genannten „early-onset-“ AD-Formen gehören, die vor dem 65. Lebensjahr auftreten, jedoch handelt es sich dabei nicht um Mutationen des TP. Die meisten Patienten erkranken an der AD vom „sporadic, late-onset-“ Typ (Lambert, Amouyel 2011), für den der größte Risikofaktor das höhere Lebensalter zu sein scheint (Ferri et al. 2006; eine Zusammenfassung der vermutlich bedeutendsten Risikofaktoren geben Ballard et al. 2011).

Die TP-Ablagerungen in der AD bestehen aus allen sechs, abnormal hyperphosphorylierten TP-Isoformen. Die der P301L-Erkrankung hingegen bestehen überwiegend aus 4-Repeat(4R)-TP (Buée, Delacourte 1999). Die 4R-Isoformen besitzen zum einen eine höhere Affinität zu den Mikrotubuli und unterstützen zum anderen deren Aufbau zweieinhalb bis drei Mal schneller als die 3-Repeat(3R)-Isoformen (Kosik et al. 1989; Goedert, Jakes 1990). Neuriten mit überwiegend 3R-TP-Isoformen scheinen länger zu sein und mehr Verzweigungen zu haben. Deren Neuronen wachsen langsamer, sind jedoch differenzierter und bilden ein dichteres neuritisches Netzwerk aus. 4R-TP hingegen herrscht überwiegend in weniger differenzierten Zellen vor und spielt möglicherweise eher in der Dynamik der Mikrotubuli eine Rolle (Mailliot et al. 2000). Demnach könnten in den Pathologien der beiden neurodegenerativen Erkrankungen Neuronenpopulationen mit verschiedenen Wachstums- und Differenzierungscharakteren betroffen sein. Es bliebe zu untersuchen in wie weit die PN mit den bezüglich ihrer TP-Isoformen unterschiedlichen Neuronen interagieren.

Sowohl die Art der Tauablagerung als auch die betroffenen Hirnregionen unterscheiden sich in den beiden Erkrankungen. Bei der P301L Mutation der FTDP-17 sind die TP-positive Ablagerungen in Nerven- und Gliazellen des Frontal- und Temporalhirns, in der Substantia nigra und im Hippocampus zu beobachten (Rizzu et al. 2000; Seilhean et al. 2011). In der Alzheimer-Pathologie erscheinen NFT zunächst im Locus coeruleus, dann in den limbischen Gebieten und erreichen schließlich den Neokortex (Braak, Braak E. 1991; Braak, Braak 1995). Aufgrund dieses Sachverhaltes wird eine Ausbreitung der Pathologie durch neuronalen Transport und Austausch zwischen synaptischen Kontakten vermutet (Jucker, Walker 2011). Es ist folglich denkbar, dass pathologisches TP zu Veränderungen von nicht-hyperphosphoryliertem-TP führt. Sydow et al. zeigten in einer Forschungsarbeit, dass exogenes humanes, pathologisches TP in einer Maus zu Veränderungen in Form von Hyperphosphorylierungen des endogenen Maus-TP führen kann. Bei anschließender Unterdrückung des humanen exogenen TP verschwanden diese, jedoch blieben dabei die Aggregationen des endogenen Maus-TP (Sydow et al. 2011).

Ohne Zweifel sind Aggregationen des TP das pathologische Kennzeichen für die neurodegenerativen Erkrankungen der Tauopathien. Doch ist es tatsächlich direkter Verursacher des Zelluntergangs? Oder ist die Aggregation, beziehungsweise die Neigung zur Aggregation, eine Art Mediator oder Trigger für andere Mechanismen, die schließlich zu Verlusten von synaptischen Kontakten und Neuronen führt?

4.2.4 Perineuronale Netze und Neuroprotektion

Trotz der noch ungeklärten direkten Auswirkungen von pathologischen, hyperphosphorylierten TP auf die von ihnen betroffenen Zellen, konnte in diesem Tiermodell der P301L-Mutation die Frage nach der möglichen Neuroprotektion durch die Perineuronalen

Netze gestellt werden. Untersucht wurde, ob im Verlauf der Erkrankung und im Vergleich zu WT-Mäusen, Veränderungen in der Anzahl der PN stattfinden. Die Degeneration und schließlich der Verlust von Neuronen ist eine Folge der Erkrankung der Frontotemporalen Demenz, die zur Atrophie von Frontal-und/oder Temporallappen führt (Bird et al. 1999; Spillantini et al. 2000; Kumar-Singh, van Broeckhoven 2007). Eine Abnahme der PN spräche für einen möglichen Zelluntergang der von ihnen umschlossenen Neuronen. Die Untersuchung der P301L-Mäuse in dieser Arbeit stellte keine signifikante Abnahme der Anzahlen der PN mit fortgeschrittenem Alter und Erkrankungsstadium fest. Dies lässt darauf schließen, dass keine wesentliche Reduktion der mit PN assoziierten Neuronen im Verlaufe der Erkrankung stattfindet und diese vor dem Zelluntergang geschützt sein könnten.

Auch bei der Untersuchung von transgenen Mäusen eines Alzheimer-Models (Tg2576), die für die Alzheimer Erkrankung charakteristischen-Ablagerung des β -Amyloids aufweisen, stellten Morawski et al. fest, dass diese keine veränderten Anzahlen von PN im Vergleich zu Mäusen vom WT aufwiesen (Morawski et al. 2010b). Untersuchungen des an AD erkrankten menschlichen Gehirns ergaben ähnliche Ergebnisse: Es gibt keine signifikante Abnahme von PN in primären und sekundären sensorischen Kortexgebieten vom Temporal-und Occipitallappen durch die Erkrankung (Brückner et al. 1999). Außerdem konnten Brückner und Kollegen feststellen, dass Kortexregionen, wie beispielsweise der Primäre Motorische Kortex oder sensorische Kortexareale, die einen hohen Anteil netztragender Neurone besitzen, weitgehend unbeschadet von der Alzheimer-Histopathologie sind (Brückner et al. 1999). Bezüglich des TP und dessen Pathologie ist jedoch bekannt, dass sich die Hirnareale nicht nur in Vorkommen und Dichte der PN sondern auch im Gehalt an TP unterscheiden (Holzer et al. 1994). Die primären motorischen und sensorischen Areale des Gehirns besitzen im Vergleich zu den hippocampalen Strukturen eine geringere Konzentration an TP. Daher scheint das Risiko, in diesen Kortex-Gebieten eine ausgeprägte Taupathologie zu entwickeln, auch geringer. Beides, TP und PN, beeinflussen vermutlich die neuronale Plastizität (Carulli et al. 2010; Holzer et al. 1994): Das TP als „Förderer“ und die PN als „Hemmer“. So ist dies eine Erklärung für die annähernd reziproken Konzentrationen in den unterschiedlichen Hirnregionen und die geringe Tau TP-Pathologie in netzreichen Arealen nicht zwangsläufig beweisend für die Neuroprotektion durch die PN.

Jedoch kommen vermutlich unbeschadete PN in enger Nachbarschaft zu Amyloid-Plaques vor (Morawski et al. 2012b). Des Weiteren waren netztragende Neuronen in Kortex und Subcortex weitgehend frei von Ablagerungen mit NFTs (Brückner et al. 1999; Morawski et al. 2010a; Morawski et al. 2012b). Diese Ergebnisse untermalend bemerkten Yasuhara et al.; dass Hyaluronsäure-positive Zellen keine ersichtliche Verbindung zu Neuronen mit der für die Alzheimer-Erkrankung charakteristischen Pathologien aufzeigen (Yasuhara et al. 1994). Trotzdem werden Bestandteile von Hyaluronsäure und Aggrecan als PN-Bausteine in Plaques

aus β -Amyloid gefunden (Morawski et al. 2010a; Morawski et al. 2012b). Doch aufgrund der Aktivierung der Gliazellen während der Erkrankung ist es denkbar, dass die von den Gliazellen freigesetzten Proteasen (in Form von Metalloproteinasen) zum Abbau der β -Amyloid-Plaques auch Bestandteile der Extrazellulären Matrix spalten könnten (Wyss-Coray, Mucke 2002; Yin et al. 2006; Rosenberg 2009; Morawski et al. 2010a; Morawski et al. 2012b). Durch einen darauffolgenden fokalen Abbau von extrazellulärer Matrix ist eine Schädigung von Neuronen möglich.

Miyata et al. behandelten neuronale Zellkulturen mit β -Amyloid und stellten fest, dass die Zellen mit einem PN diese neurotoxische Noxe unbeschadet überstanden während die PN-freien Neuronen untergingen. Nach Behandlung mit Chondroitinase und dem somit induzierten Abbau der PN starben auch die netztragenden Zellen (Miyata et al. 2007). Nicht nur die Reaktion der PN gegenüber β -Amyloid wurde untersucht. Schüppel et al. beobachteten, dass netztragende Neuronen in mit Trimethyltin vergiftete Ratten überlebten, während benachbarte Pyramidenzellen im Hippocampus zerstört wurden. Auch wurden die PN nicht durch die aktivierten Mikroglia abgebaut.

Okamoto et al. stellten zudem einen vor dem Zelltod schützenden Effekt der Chondroitinsulfatproteoglykane gegenüber N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), Kainat und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propion-Säure (AMPA) fest (Okamoto et al. 1994). Vermutet wird hier, dass die mögliche Pufferfunktion der negativ geladenen Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG) gegenüber Kationen die Exzitotoxizität, von beispielsweise Kainat, verringern (Härtig et al. 1999).

Eine weitere Studie, die in netztragenden Neuronen sowie in PN-reichen Regionen geringere Mengen von Lipofuszin-Ansammlungen entdeckte, unterstreicht die Hypothese der Neuroprotektion durch die Perineuronalen Netze (Morawski et al. 2004). Lipofuszin ist das Pigment des Alterns. Es kommt lysosomal in postmitotischen Zellen vor und nimmt mit dem Alter der Zelle zu. Doch es gilt nicht nur als das Kennzeichen zellulären Alterns sondern es wird zudem als ein Marker oxidativen Stresses angesehen (Poorkaj 2002; Brunk, Terman 2002). So sprächen die geringeren Lipofuszin-Vorkommen dafür, dass die Zellen der PN weniger oxidativem Stress ausgesetzt sind. Möglicherweise ist hier der polyanionische Charakter der PN für den Schutz der Zellen ursächlich, indem es als Radikalfänger dient und durch Bindung die freien Radikale für die Zellen unschädlich macht (Brückner et al. 1993; Morawski et al. 2004). Des Weiteren zeigten Suttkus et al. in einem In-vivo-Mausmodell, dass Zellen mit PN bei induzierter Schädigung durch Eisen(III)-Chlorid signifikant weniger Degenerationen zeigten als Neuronen ohne PN, vermutlich aufgrund der Pufferung von Kationen durch die Chondroitinsulfatproteoglykane (CSPG) der Perineuronalen Netze (Suttkus et al. 2012).

Es gibt viele Hinweise darauf, dass dem Überleben der PN, und der von ihnen umhüllten Neurone, bei neurodegenerativen Erkrankungen eine erhöhte Resistenz gegenüber schädigender Noxen zu Grunde liegt und daraus folgend eine neuroprotektive Eigenschaft der Perineuronalen Netze. Die Mechanismen, die dieser möglichen Neuroprotektion zu Grunde liegen könnten, sind jedoch noch ungeklärt. So wäre es auch künftig von großem Interesse, die netztragenden Neurone in Zusammenhang mit weiteren neurodegenerativen Erkrankungen zu untersuchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae

Die potentielle neuroprotektive Funktion Perineuronaler Netze gegenüber Tau Protein Hyperphosphorylierungen und neurofibrillären Tangles in einem Mausmodell der Frontotemporalen Demenz (P301L)

Eingereicht von: Sandra Schmutzler
Geboren am 21.11.1986 in Leipzig

Angefertigt am: Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung,
Abteilung Molekulare und Zelluläre Mechanismen der
Neurodegeneration

Betreuer: Prof. Dr.med. Thomas Arendt

Mitbetreuer: PD Dr. Dr. Markus Morawski

Engereicht: November 2013

Perineuronale Netze (PN) sind eine spezielle Form der Extrazellulären Matrix, bestehend aus Hyaluronsäure, Lecticanen, Tenascin-R und Link-Proteinen, welche vermutlich neuroprotektive Eigenschaften besitzt (Yamaguchi 2000; Brückner et al. 2000; Dityatev, Schachner 2003; Morawski et al. 2012a). Untersuchungen der PN bei der Alzheimerschen Erkrankung (AD) zeigten, dass die netztragenden Neurone weitestgehend frei von der für AD charakteristischen Pathologie waren (Brückner et al. 1999; Morawski et al. 2010b; Morawski et al. 2010a; Morawski et al. 2012b; Lendvai et al. 2013). In dieser Forschungsarbeit wurde die vermutete Neuroprotektion durch PN anhand eines Mausmodells untersucht. Dieses exprimiert die P301L-Mutation des Tau-Proteins (TP), die Ursache einer Form der Frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17) ist. Histopathologisch ist diese Erkrankung gekennzeichnet durch intrazelluläre Hyperphosphorylierungen (HP) und Aggregationen des TP bis hin zur Bildung Neurofibrillärer Tangles (NFTs).

Es wurden je drei Gehirne von Mäusen mit der P301L-Mutation im Alter von drei und achteinhalb Monaten untersucht. Dabei wurden sechs Hirnregionen ausgewählt, die sich teilweise sehr in Funktion, PN-Vorkommen und TP-Pathologie unterscheiden: Primärer

Somatosensorischer Kortex (PSC), Entorhinaler Kortex (EC), Hippokampus (Hipp), Pars magnocellularis des Nucleus ruber (NR-m), Pars reticulata der Substantia nigra (SN-r) und Motorischer Trigemuskern (Mo5). Die PN und die TP-Pathologien, HP und NFT, wurden mit spezifischen Antikörpern immunhistochemisch markiert, mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgezählt und deren Zusammenhang in Kreuztabellen ausgewertet. Zur statistischen Analyse wurden Odds ratios und Logits errechnet. Auch wurde ein Protein-Nachweis mittels Western Blot durchgeführt.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- 1) Sind netztragende Neuronen weniger von den TP-Ablagerungen (HP und NFT) betroffen als Neuronen ohne PN?
- 2) Gibt es eine Abnahme in der Anzahl der PN mit fortschreitender Erkrankung?

Die Ergebnisse sind im Folgenden stichpunktartig zusammengefasst:

- Die TP- Pathologien kommen sowohl in den Neuronen mit PN, als auch in den Neuronen ohne PN vor, mit teilweise großen Unterschieden zwischen den Hirnregionen.

Es kann unterschieden werden in:

- die motorischen, subcortikalen, PN-reichen Hirngebiete (Mo5, SN-r und NR-m) bei denen schon in den drei Monate alten Mäusen die netztragenden Neuronen mehr hyperphosphoryliertes TP aufweisen als die nicht-netztragenden. Dies verdeutlicht sich in den achteinhalb Monate alten Mäusen.
- die nicht-motorischen, PN-ärmeren, kortikalen Hirnregionen (PSC, Hipp, EC), bei denen die TP-Ablagerungen in den jungen Tieren überwiegend in den nicht-netztragenden Neuronen zu beobachten sind. In den älteren Mäusen hingegen werden die HP vermehrt in den netztragenden Neuronen nachgewiesen. NFT finden sich nur in den Neuronen ohne PN.
- Es gibt keine signifikante Abnahme der PN in den transgenen P301L-Mäusen, sowohl im Vergleich zu den Wildtyp (WT)-Mäusen als auch im fortgeschrittenen Alter.

Es kann demzufolge nicht die Hypothese bestätigt werden, dass die PN generell vor TP-HP und Bildung von NFT schützen. Trotzdem scheinen die netztragenden Zellen mit TP-Pathologie erhalten zu bleiben. Ein Rückgang der PN im Progress der Erkrankung wurde nicht festgestellt. So kann weiterhin diskutiert werden, ob PN trotz intrazellulärem, verändertem TP einen Schutz vor dem Zelluntergang darstellen und folglich für eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber schädigender, neurodegenerativer Prozesse sorgen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alonso, A. d. C.; Li, B.; Grundke-Iqbal, I. und Iqbal, K. (2006): Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 8864–8869.
- Alonso, A. d. C.; Zaidi, T.; Novak, M.; Barra, H. S.; Grundke-Iqbal, I. und Iqbal, K. (2001): Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. *J Biol Chem*, 276, 37967–37973.
- Alpár, A.; Gärtner, U.; Härtig, W. und Brückner, G. (2006): Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Res*, 1120, 13–22.
- Andorfer, C.; Kress, Y.; Espinoza, M.; Silva, R. de, Tucker, K. L.; Barde, Y.-A.; Duff, K. und Davies, P. (2003): Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem*, 86, 582–590.
- Andreadis, A.; Broderick, J. A. und Kosik, K. S. (1995): Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res*, 23, 3585–3593.
- Andreadis, A.; Brown, W. M.; Kosik, K. S.; Andreadis, A.; Brown, W. M. und Kosik, K. S. (1992): Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry*, 31, 10626–10633.
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) (2009), *S3-Leitlinie "Demenzen": Langversion 038/013*
- Arendt, T. (2001): Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization. *Neuroscience*, 102, 723–765.
- Asher, R. A.; Scheibe, R. J.; Keiser, H. D.; Bignami, A.; Asher, R. A.; Scheibe, R. J.; Keiser, H. D. und Bignami, A. (1995): On the existence of a cartilage-like proteoglycan and link proteins in the central nervous system. *Glia*, 13, 294–308.
- Asperg, A.; Miura, R.; Bourdoulous, S.; Shimonaka, M.; Heinegard, D.; Schachner, M.; Ruoslahti, E.; Yamaguchi, Y.; Asperg, A.; Miura, R.; Bourdoulous, S.; Shimonaka, M.; Heinegård, D.; Schachner, M. und Ruoslahti, E. (1997): The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10116–10121.

- Augustinack, J.; Schneider, A.; Mandelkow, E.-M. und Hyman, B. (2002): Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 103, 26–35.
- Ballard, C.; Gauthier, S.; Corbett, A.; Brayne, C.; Aarsland, D. und Jones, E. (2011): Alzheimer's disease. *The Lancet*, 377, 1019–1031.
- Ballatore, C.; Lee, V. M.-Y. und Trojanowski, J. Q. (2007): Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*, 8, 663–672.
- Bandtlow, C. E. und Zimmermann, D. R. (2000): Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. REVIEW. *Physiol Rev*, 80, 1267–1290.
- Barritt, A. W.; Davies, M.; Marchand, F.; Hartley, R.; Grist, J.; Yip, P.; McMahon, S. B. und Bradbury, E. J. (2006): Chondroitinase ABC Promotes Sprouting of Intact and Injured Spinal Systems after Spinal Cord Injury. *J Neurosci*, 26, 10856–10867.
- Bekku, Y.; Suab, W.-D.; Hirakawaa, S.; Fässler, R.; Ohtsuka, A.; Kang, J. S.; Sanders, J.; Murakami, T.; Ninomiya, Y.; Oohashi, T.; Su, W.-D. und Hirakawa, S. (2003): Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosci*, 24, 148–159.
- Bertolotto, A.; Manzardo, E. und Guglielmone, R. (1996): Immunohistochemical mapping of perineuronal nets containing chondroitin unsulfated proteoglycan in the rat central nervous system. *Cell Tissue Res*, 283, 283–295.
- Bignami, A.; Asher, R. A.; Perides, G. und Rahemtulla, F. (1992): The extracellular matrix of cerebral gray matter: Golgi's pericellular net and Nissl's nervösen grau revisited. *Int J Dev Neurosci*, 10, 291–299.
- Bi, M.; Ittner, A.; Ke, Y. D.; Götz, J.; Ittner, L. M. und Ferreira, S. T. (2011): Tau-Targeted Immunization Impedes Progression of Neurofibrillary Histopathology in Aged P301L Tau Transgenic Mice. *PLoS ONE*, 6, e26860.
- Bird, T. D.; Nochlin, D.; Poorkaj, P.; Cherrier, M.; Kaye, J.; Payami, H.; Peskind, E.; Lampe, T. H.; Nemens, E.; Boyer, P. J. und Schellenberg, G. D. (1999): A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain*, 122, 741–756.
- Blosa, M.; Sonntag, M.; Brückner, G.; Jäger, C.; Seeger, G.; Matthews, R.; Rübsamen, R.; Arendt, T. und Morawski, M. (2013): Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body – Implications for physiological functions. *Neuroscience*, 228, 215–234

- Borchelt, D. R.; Davis, J.; Fischer, M.; Lee, M. K.; Slunt, H. H.; Ratovitsky, T.; Regard, J.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Sisodia, S. S. und Price, D. L. (1996): A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet Anal*, 13, 159–163.
- Bortz, J. und Lienert, G. A. (2008): *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung. Leitfaden für die verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben ; mit 97 Tabellen sowie zahlreichen Formeln*. 3.; aktualisierte und bearb. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin, 2008 (Springer-Lehrbuch Bachelor, Master).
- Braak, H. und Braak E. (1991): Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82, 239–259.
- Braak, H. und Braak, E. (1995): Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*, 16, 271–278.
- Bradbury, E. J.; Moon, L. D. F.; Popat, R. J.; King, R. von, Bennett, G. S.; Patel, P. N.; Fawcett, J. W.; McMahon, S. B. und McMahon, S. B. (2002): Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416, 636–640.
- Brauer K.; Werner L.; Leibnitz L. (1982): Perineuronal nets of glia. *J Hirnforsch*, 23, 701-708.
- Brückner, G.; Brauer, K.; Härtig, W.; Wolff, J. R.; Rickmann, M. J.; Derouiche, A.; Delpech, B.; Girard, N.; Oertel, W. H. und Reichenbach, A. (1993): Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*, 8, 183–200.
- Brückner, G.; Grosche, J.; Schmidt, S.; Härtig, W.; Margolis, R. U.; Delpech, B.; Seidenbecher, C. I.; Czaniera, R.; Schachner, M.; Brückner, G.; Grosche, J.; Schmidt, S.; Härtig, W.; Margolis, R. U.; Delpech, B.; Seidenbecher, C. I.; Czaniera, R. und Schachner, M. (2000): Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol*, 428, 616–629.
- Brückner, G.; Hausen, D.; Härtig, W.; Drlicek, M.; Arendt, T. und Brauer, K. (1999): Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 92, 791–805.
- Brückner, G.; Morawski, M.; Arendt, T.; Brückner, G.; Morawski, M. und Arendt, T. (2008): Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience*, 151, 489–504.
- Brunk, U. T. und Terman, A. (2002): Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*, 33, 611–619.

- Buée, L. und Delacourte, A. (1999): Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease. *Brain Pathol*, 9.
- Bukalo, O.; Schachner, M. und Dityatev, A. (2001): Modification of Extracellular Matrix by enzymatic Removal of Chondroitin Sulfate and by lack of Tenascin-R differentially affects several forms of Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Neuroscience*, 104, 359–369.
- Burnette, W. (1981): "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112, 195–203.
- Cairns, N. J.; Bigio, E. H.; Mackenzie, I. R. A.; Neumann, M.; Lee, V. M.-Y.; Hatanpaa, K. J.; White, C. L.; Schneider, J. A.; Grinberg, L. T.; Halliday, G.; Duyckaerts, C.; Lowe, J. S.; Ida E. Holm, T. M.; Okamoto, K.; Yokoo, H.; Murayama, S.; Woulfe, J.; Munoz, D. G.; Dickson, D. W.; Ince, P. G.; Trojanowski, J. Q. und Mann, D. M. A. (2007): Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol*, 114, 5–22.
- Carulli, D.; Pizzorusso, T.; Kwok, J. C. F.; Putignano, E.; Poli, A.; Forostyak, S.; Andrews, M. R.; Deepa, S. S.; Glant, T. T. und Fawcett, J. W. (2010): Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*, 133, 2331–2347.
- Carulli, D.; Rhodes, K. E.; Brown, D. J.; Bonnert, T. P.; Pollack, S. J.; Oliver, K.; Strata, P. und Fawcett, J. W. (2006): Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol*, 494, 559–577.
- Carulli, D.; Rhodes, K. E. und Fawcett, J. W. (2007): Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J Comp Neurol*, 501, 83–94.
- Celio, M. R. und Blümcke, I. (1994): Perineuronal nets - a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. REVIEW. *Brain Res Rev*, 19, 128–145.
- Celio, M. R.; Chiquet-Ehrismann, R.; Celio, M. R. und Chiquet-Ehrismann, R. (1993): 'Perineuronal nets' around cortical interneurons expressing parvalbumin are rich in tenascin. *Neurosci Lett*, 162, 137–140.
- Celio, M. R.; Spreafico, R.; Biasi, S. deund Vitellaro-Zuccarello, L. (1998): Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci*, 21, 510–515.
- Chiquet-Ehrismann, R. (2004): Tenascins. Molecules in focus. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 986–990.

- Cleveland, D. W.; Hwo, S.-Y. und Kirschner, M. W. (1977): Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol*, 116, 207–225.
- D'Souza, I.; Schellenberg, G. D. und D'Souza, I. (2005): Regulation of tau isoform expression and dementia. REVIEW. *Biochim Biophys Acta*, 1739, 104–115.
- Deters, N.; Ittner, L. M. und Götz, J. (2008): Divergent phosphorylation pattern of tau in P301L tau transgenic mice. *Eur J Neurosci*, 28, 137–147.
- Dityatev, A.; Brückner, G.; Dityateva, G.; Grosche, J.; Kleene, R. und Schachner, M. (2007): Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Devel Neurobio*, 67, 570–588.
- Dityatev, A. und Schachner, M. (2003): Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 4, 456–468.
- Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H. und Huang, Y. (2006): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, 366, 2112–2117.
- Foscarin, S., Ponchione, D., Pajaj, E., Leto, K., Gawlak, M., Wilczynski, G. M., Rossi, F. und Carulli, D. (2011): Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses. *PLoS ONE*, 6, e16666.
- Franklin, K. B. J. und Paxinos, G. (2001): The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2. Aufl. San Diego, Calif. [u.a.]: Acad. Press, 2001.
- Galtrey, C. M. und Fawcett, J. W. (2007): The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. REVIEW. *Brain Res Rev*, 54, 1–18.
- Garcia-Alias, G.; Petrosyan, H. A.; Schnell, L.; Horner, P. J.; Bowers, W. J.; Mendell, L. M.; Fawcett, J. W. und Arvanian, V. L. (2011): Chondroitinase ABC Combined with Neurotrophin NT-3 Secretion and NR2D Expression Promotes Axonal Plasticity and Functional Recovery in Rats with Lateral Hemisection of the Spinal Cord. *J Neurosci*, 31, 17788–17799.
- Gärtner, U.; Janke, C.; Holzer, M.; Vanmechelen, E. und Arendt, T. (1998): Postmortem changes in the phosphorylation state of tau-protein in the rat brain. *Neurobiol. Aging*, 19, 535–543.
- Giamanco, K. A.; Morawski, M. und Matthews, R. T. (2010): Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience*, 170, 1314–1327.

- Goedert, M. und Jakes, R. (1990): Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*, 4225–4230.
- Goedert, M. und Spillantini, M. G. (2011): Pathogenesis of the Tauopathies. *J Mol Neurosci*, 45, 425–431.
- Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Potier, M. C.; Ulrich, J.; Crowther, R. A. und Goedert, M. (1989): Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J*, 8, 393–399.
- Gomez-Isla, T.; Hollister, R.; West, H.; Mui, S.; Growdon, J. H.; Petersen, R. C.; Parisi, J. E. und Hyman, B. T. (1997): Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 41, 17–24.
- Götz, J.; Chen, F.; Barmettler, R. und Nitsch, R. M. (2000): Tau Filament Formation in Transgenic Mice Expressing P301L Tau. *J Biol Chem*, 276, 529–534.
- Götz, J.; Chen, F.; van Dorpe, J. und Nitsch, R. M. (2001): Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*, 293, 1491–1495.
- Graff-Radford, N. R.; und Woodruff, B. K. (2007): Frontotemporal dementia. Review. *Semin Neurol*, 27, 48–57.
- Hagihara, K.; Miura, R.; Kosaki, R.; Berglund, E.; Ranscht, B. und Yamaguchi, Y. (1999): Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol*, 410, 256–264.
- Härtig, W.; Brauer, K.; Bigl, V. und Brückner, G. (1994): Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Res*, 635, 307–311.
- Härtig, W.; Brauer, K.; Brückner, G.; Härtig, W.; Brauer, K. und Brückner, G. (1992): Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*, 3, 869–872.
- Härtig, W.; Derouiche, A.; Welt, K.; Brauer, K.; Grosche, J.; Mäder, M.; Reichenbach, A. und Brückner, G. (1999): Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res*, 842, 15–29.

- Hasegawa, M.; Smith, M. J. und Goedert, M. (1998): Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett*, 437, 207–210.
- Hilgers, R.-D.; Scheiber, V. und Bauer, P. (2007): Einführung in die Medizinische Statistik. Zweite, verbesserte und überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- Hobohm, C.; Härtig, W.; Brauer, K.; Brückner, G.; Hobohm, C.; Härtig, W.; Brauer, K. und Brückner, G. (1998): Low expression of extracellular matrix components in rat brain stem regions containing modulatory aminergic neurons. *J Chem Neuroanat*, 15, 135–142.
- Hockfield S.; McKay R.D. (1983): A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 5758–5761.
- Hockfield S., Kalb RG, Zaremba Sund Fryer H. (1990): Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 55, 505–514.
- Holzer, M.; Holzapfel, H.-P.; Zedlick, D.; Brückner, M. K. und Arendt, T. (1994): Abnormally phosphorylated Tau Protein in Alzheimer's Disease: Heterogeneity of individual regional Distribution and Relationship to clinical Severity. *Neuroscience*, 63, 499–516.
- Horn, A. K.; Brückner, G.; Härtig, W. und Messoudi, A. (2003): Saccadic omnipause and burst neurons in monkey and human are ensheathed by perineuronal nets but differ in their expression of calcium-binding proteins. *J Comp Neurol*, 455, 341–352.
- Hrabtova, S.; Masri, D.; Tao, L.; Xiao, F. und Nicholson, C. (2009): Calcium diffusion enhanced after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC. *The Journal of Physiology*, 587, 4029–4049.
- Huey, E. D.; T. Putnam, K.; Grafman, J. und Putnam, K. T. (2006): A systematic review of neurotransmitter deficits and treatments in frontotemporal dementia. *Neurology*, 66, 17–22.
- Hutton, M. (2000): Molecular Genetics of Chromosome 17 Tauopathies. *Ann N Y Acad Sci*, 920, 63–73.
- Hutton, M. (2001): Missense and splice site mutations in tau associated with FTDP-17: multiple pathogenic mechanisms. *Neurology*, 56, 21–25.
- Hutton, M.; Lendon, C. L.; Rizzu, P.; Baker, M.; Froelich, S.; Houlden, H.; Pickering-Brown, S.; Chakraverty, S.; Isaacs, A.; Grover, A.; Hackett, J.; Adamson, J.; Lincoln, S.; Dickson, D.; Davies, P.; Petersen, R. C.; Stevens, M.; Graaff, E. de, Wauters, E.; van Baren, J.; Hillebrand, M.; Joosse, M.; Kwon, J. M.; Nowotny, P.; Che, L. K.; Norton, J.; Morris, J. C.; Reed, L. A.;

- Trojanowski, J.; Basun, H.; Lannfelt, L.; Neystat, M.; Fahn, S.; Dark, F.; Tannenberg, T.; Dodd, P. R.; Hayward, N.; Kwok, J. B.; Schofield, P. R.; Andreadis, A.; Snowden, J.; Craufurd, D.; Neary, D.; Owen, F.; Oostra, B. A.; Hardy, J.; Goate, A.; van Swieten, J.; Mann, D.; Lynch, T. und Heutink, P. (1998): Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, 393, 702–705.
- Ishizuka, T.; Nakamura, Masayuki, Ichiba, M.; Sano, A. und Nakamura, M. (2011): Familial semantic dementia with P301L mutation in the Tau gene. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 31, 334–340
- Jellinger, K. A. (2008): Neuropathological Aspects of Alzheimer Disease, Parkinson Disease and Frontotemporal Dementia. *Neurodegenerative Dis*, 5, 118–121.
- Josephs, K. A. (2007): Frontotemporal lobar degeneration. *Neurol Clin*, 25, 683–696.
- Jucker, M. und Walker, L. C. (2011): Pathogenic protein seeding in alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol*, 70, 532–540.
- Karetko, M. und Skangiel-Kramska, J. (2009): Diverse functions of perineuronal nets. REVIEW. *Acta Neurobiol Exp*, 69, 564–577.
- Koedam, E. L.; van der Flier, W. M.; Barkhof, F.; Koene, T.; Scheltens, P. und Pijnenburg, Y. A. (2010): Clinical Characteristics of Patients With Frontotemporal Dementia With and Without Lobar Atrophy on MRI. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 24, 242–247.
- Köppe, G.; Brückner, G.; Härtig, W.; Delpech, B. und Bigl, V. (1997): Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *Histochem J*, 29, 11–20.
- Kosik, K. S.; Orecchio, L. D.; Bakalis, S. und Neve, R. L. (1989): Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*, 2, 1389–1397.
- Kremer, A.; Maurin, H.; Demedts, D.; Devijver, H.; Borghgraef, P. und van Leuven, F. (2011): Early Improved and Late Defective Cognition Is Reflected by Dendritic Spines in Tau.P301L Mice. *J Neurosci*, 31, 18036–18047.
- Kumar-Singh, S. und van Broeckhoven, C. (2007): Frontotemporal Lobar Degeneration: Current Concepts in the Light of Recent Advances. *Brain Pathol*, 17, 104–114.
- Kwok, J. C. F.; Carulli, D. und Fawcett, J. W. (2010): In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem*, 114, 1447–1459.
- Lambert, J.-C. und Amouyel, P. (2011): Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev*, 21, 295–301.

- Lee, G.; Neve, R. und Kosik, K. S. (1989): The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*, 2, 1615–1624.
- Lendvai, D.; Morawski, M.; Négyessy, L.; Gáti, G.; Jäger, C.; Baksa, G.; Glasz, T.; Attems, J.; Tanila, H.; Arendt, T.; Harkany, T. und Alpár, A. (2013): Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 125, 215–229.
- Lewis, J.; McGowan, E.; Rockwood, J.; Heather, M.; Nacharaju, P.; van Slegtenhorst, M.; Gwinn-Hardy, K.; Murphy, M. P.; Baker, M.; Yu, X.; Duff, K.; Hardy, J.; Corral, A.; Lin, W.-L.; Yen, S.-H.; Dickson, D. W.; Davies, P. und Hutton, M. (2000): Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*, 26, 402–405.
- Lin, W.-L.; Lewis, J.; Yen, S.-H.; Hutton, M. und Dickson, D. W. (2003): Filamentous Tau in Oligodendrocytes and Astrocytes of Transgenic Mice Expressing the Human Tau Isoform with the P301L Mutation. *Am J Pathol*, 162, 213–218.
- Liu, F. und Gong, C.-X. (2008): Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Mol Neurodegener*, 3, 8.
- Mailliot, C.; Bussi re, T.; Hamdane, M.; Sergeant, N.; Caillet, M.-L.; Delacourte, A. und Bu e, L. (2000): Pathological tau phenotypes. The weight of mutations, polymorphisms, and differential neuronal vulnerabilities. *Ann N Y Acad Sci*, 920, 107–114.
- Martin, L.; Latypova, X. und Terro, F. (2011): Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. REVIEW. *Neurochem Int*, 58, 458–471.
- Massey, J. M.; Hubscher, C. H.; Wagoner, M. R.; Decker, J. A.; Amps, J.; Silver, J. und Onifer, S. M. (2006): Chondroitinase ABC Digestion of the Perineuronal Net Promotes Functional Collateral Sprouting in the Cuneate Nucleus after Cervical Spinal Cord Injury. *J Neurosci*, 26, 4406–4414.
- Matsuo, E. S.; Shin, R.-W.; Billingsley, M.; van deVoorde, A.; O'Connor, M.; Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M.-Y. (1994): Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*, 13, 989–1002.
- Matthews, R. T.; Kelly, G. M.; Zerillo, C. A.; Gray, G.; Tiemeyer, M. und Hockfield, S. (2002): Aggrecan Glycoforms Contribute to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets. *J Neurosci*, 22(17), 7536–7547.

- McRae, P. A.; Rocco, M. M.; Kelly, G.; Brumberg, J. C. und Matthews, R. T. (2007): Sensory Deprivation Alters Aggrecan and Perineuronal Net Expression in the Mouse Barrel Cortex. *J Neurosci*, 27, 5405–5413.
- Mercy L.; Hodges, J.; Dawson K.; Barker R.A. und Brayne, C. (2008): Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom. *Neurology*, 71, 1496–1499.
- Miyata, S.; Nishimura, Y. und Nakashima, T. (2007): Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res*, 1150, 200–206.
- Moon, L. D. F.; Asher, R. A.; Rhodes, K. E. und Fawcett, J. W. (2001): Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci*, 4, 465–466.
- Morawski, M.; Brückner, G.; Arendt, T. und Matthews, R. T. (2012a): Aggrecan: Beyond cartilage and into the brain. Article in press. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 690–693.
- Morawski, M.; Brückner, G.; Jäger, C.; Seeger, G.; Arendt, T.; Morawski, M.; Brückner, G.; Jäger, C.; Seeger, G. und Arendt, T. (2010a): Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 169, 1347–1363.
- Morawski, M.; Brückner, G.; Jäger, C.; Seeger, G.; Matthews, R. T. und Arendt, T. (2012b): Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathol*, 22, 547–561.
- Morawski, M.; Brückner, M. K.; Riederer, P.; Brückner, G. und Arendt, T. (2004): Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol*, 188, 309–315.
- Morawski, M.; Pavlica, S.; Seeger, G.; Grosche, J.; Kouznetsova, E.; Schliebs, R.; Brückner, G. und Arendt, T. (2010b): Perineuronal nets are largely unaffected in Alzheimer model Tg2576 mice. *Neurobiol Aging*, 31, 1254–1256.
- Morris, M.; Maeda, S.; Vossel, K. und Mucke, L. (2011): The Many Faces of Tau. *Neuron*, 70, 410–426.
- Morris, N. P. und Henderson, Z. (2000): Perineuronal nets ensheath fast spiking, parvalbumin-immunoreactive neurons in the medial septum/diagonal band complex. *Eur J Neurosci*, 12, 828–838.
- Müller, M.; Gleixner, C. und Wirth, S.-B. (2011): *Neurologie und Psychiatrie. für Studium und Praxis 2010/2011. Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen.* 8. Aufl. Unter Mitarbeit von M. Sander, A. Elsen und R. Genius et al. Breisach am Rhein: Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2011.

- Neary, D.; Snowden, J.; Gustafson, L.; Passant, U.; Stuss, D.; Black, S.; Freedman, M.; Kertesz, A.; Robert, P.; Albert, M.; Boone, K.; Miller, B.; Cummings, J.; Benson, D.; Snowden, J. S.; Robert, P. H.; Miller, B. L. und Benson, D. F. (1998): Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology*, 51, 1546–1554.
- Okamoto, M.; Mori, S.; Ichimura, M.; Endo, H.; Okamoto, M.; Mori, S.; Ichimura, M. und Endo, H. (1994): Chondroitin sulfate proteoglycans protect cultured rat's cortical and hippocampal neurons from delayed cell death induced by excitatory amino acids. *Neurosci Lett*, 172, 51–54.
- Oohira, A.; Matsui, F.; Tokita, Y.; Yamauchi, S.; Aono, S.; Oohira, A.; Matsui, F.; Tokita, Y.; Yamauchi, S. und Aono, S. (2000): Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Arch Biochem Biophys*, 374, 24–34.
- Overk, C. R.; Kelley, C. M. und Mufson, E. J. (2009): Brainstem Alzheimer's-like pathology in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 35, 415–425.
- Pick, A. (1892): Ueber die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prager Medicinische Wochenschrift*, 17, 165–167.
- Pizzorusso, T.; Medini, P.; Berardi, N.; Chierzi, S.; Fawcett, J. W. und Maffei, L. (2002): Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 298, 1248–1251.
- Poorkaj, P. (2002): Pigments in Aging: An Overview. *Ann N Y Acad Sci*, 959, 57–65.
- Rabinovici, G. D. und Miller, B. L. (2010): Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs*, 24, 375–398.
- Ramsden, M.; Kotilinek, L.; Forster, C.; Paulson, J.; McGowan, E.; Santa Cruz, K.; Guimaraes, A.; Yue, M.; Lewis, J.; Carlson, G.; Hutton, M. und Ashe, K. H. (2005): Age-Dependent Neurofibrillary Tangle Formation, Neuron Loss, and Memory Impairment in a Mouse Model of Human Tauopathy (P301L). *J Neurosci*, 46, 10637–10647.
- Ratnavalli, R.; Brayne, C.; Dawson, K.; Hodgesund J.R. (2002): The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*, 58, 1615–1621.
- Renart, J.; Reiser, J. und Stark, G. R. (1979): Transfer of Proteins from Gels to Diazobenzylxymethyl-Paper and Detection with Antisera: A Method for Studying Antibody Specificity and Antigen Structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3116–3120.
- Rizzu, P.; Joosse, M.; Ravid, R.; Hoogeveen, A.; Kamphorst, W.; van Swieten, J. C.; Willemsen, R. und Heutink, P. (2000): Mutation-dependent aggregation of tau protein and its selective

- depletion from the soluble fraction in brain of P301L FTDP-17 patients. *Hum Mol Genet*, 9, 3075–3082.
- Rosenberg, G. A. (2009): Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*, 8, 205–216.
- Rosso, S. M.; Donker Kaat, L.; Baks, T.; Joosse, M.; Koning, I. de, Pijnenburg, Y. A.; Jong, D. de, Dooijes, D.; Kamphorst, W.; Ravid, R.; Niermeijer, M. F.; Verheij, F.; Kremer, H.; Scheltens, P.; van Duijn, C. M.; Heutink, P.; van Swieten, J. C.; Pijnenburg, Y.; Jong, D. de und Kremer, H. P. (2003): Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain*, 126, 2016–2022.
- Santa Cruz, K.; Lewis, J.; Spires, T.; Paulson, J.; Kotilinek, L.; Ingelsson, M.; Guimaraes, A.; DeTure, M.; Ramsden, M.; McGowan, E.; Forster, C.; Yue, M.; Orne, J.; Janus, C.; Mariash, A.; Kuskowski, M.; Hyman, B. T.; Hutton, M. und Ashe, K. H. (2005): Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*, 309, 476–481.
- Schünke, M.; Schulte, E.; Schumacher, U.; Voll, M. und Wesker, K. (2009): PROMETHEUS Kopf, Hals und Neuroanatomie. 115 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2009.
- Schüppel, K.; Brauer, K.; Härtig, W.; Grosche, J.; Earley, B.; Leonard, B. E. und Brückner, G. (2002): Perineuronal nets of extracellular matrix around hippocampal interneurons resist destruction by activated microglia in trimethyltin-treated rats. *Brain Res*, 958, 448–453.
- Schwartz, N. B.; Domowicz, M.; Krueger, R. C.; Li, H. und Mangoura, D. (1996): Brain aggrecan. *Perspect Dev Neurobiol*, 3, 291–306.
- Seeger, G.; Brauer, K.; Härtig, W. und Brückner, G. (1994): Mapping of Perineuronal Nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide histochemistry and lectin cytochemistry. *Neuroscience*, 58, 371–388.
- Seidenbecher, C. I.; Richter, K.; Rauch, U.; Fässler, R.; Garner, C. C. und Gundelfinger, E. D. (1995): Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. *J Biol Chem*, 270, 27206–27212.
- Seilhean, D.; Ber, I.; Sarazin, M.; Lacomblez, L.; Millecamps, S.; Salachas, F.; Pradat, P.-F.; Forestier, N.; LeGuern, E.; Dubois, B.; Meininger, V.; Brice, A.; Hauw, J.-J. und Duyckaerts, C. (2011): Fronto-temporal lobar degeneration: neuropathology in 60 cases. *J Neural Transm*, 118, 753–764..
- Soleman, S.; Yip, P. K.; Duricki, D. A. und Moon, L. D. F. (2012): Delayed treatment with chondroitinase ABC promotes sensorimotor recovery and plasticity after stroke in aged rats. *Brain*, 135, 1210–1223.

- Spillantini, M. G.; Bird, T. D. und Ghetti, B. (1998): Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol*, 2, 387–402.
- Spillantini, M. G. und Goedert, M. (1998): Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, 21, S. 428–433.
- Spillantini, M. G.; van Swieten, J. C. und Goedert, M. (2000): Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Neurogenetics*, 2, 193–205.
- Spires-Jones, T. L.; Stoothoff, W. H.; Calignon, A. de, Jones, P. B. und Hyman, B. T. (2009): Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci*, 32, 150–159.
- Stieler, J. T.; Bullmann, T.; Kohl, F.; Tøien, Ø.; Brückner, M. K.; Härtig, W.; Barnes, B. M. und Arendt, T. (2011): The physiological link between metabolic rate depression and tau phosphorylation in mammalian hibernation. *PLoS ONE*, 6, e14530.
- Suttkus, A.; Rohn, S.; Jäger, C.; Arendt, T. und Morawski, M. (2012): Neuroprotection against iron-induced cell death by perineuronal nets - an in vivo analysis of oxidative stress. *Am J Neurodegener Dis*, 1, 122–129.
- Sydow, A.; van der Jeugd, A.; Zheng, F.; Ahmed, T.; Balschun, D.; Petrova, O.; Drexler, D.; Zhou, L.; Rune, G.; Mandelkow, E.; D'Hooge, R.; Alzheimer, C. und Mandelkow, E.-M. (2011): Tau-Induced Defects in Synaptic Plasticity, Learning, and Memory Are Reversible in Transgenic Mice after Switching Off the Toxic Tau Mutant. *J Neurosci*, 31, 2511–2525.
- Tackenberg, C. und Brandt, R. (2009): Divergent Pathways Mediate Spine Alterations and Cell Death Induced by Amyloid-, Wild-Type Tau, and R406W Tau. *J Neurosci*, 29, 14439–14450.
- Tolnay, M. und Probst, A. (2003): The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies. *IUBMB Life*, 55, 299–305.
- Trepel, M. (2004): *Neuroanatomie. Struktur und Funktion. Mit 285 Abbildungen und 27 Tabellen.* 3. Aufl. München: Elsevir GmbH, Urban & Fischer Verlag; Urban & Fischer, 2004.
- Wang, D. und Fawcett, J. (2012): The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res*, 349, 147–160.
- Wang, D.; Ichiyama, R. M.; Zhao, R.; Andrews, M. R. und Fawcett, J. W. (2011): Chondroitinase Combined with Rehabilitation Promotes Recovery of Forelimb Function in Rats with Chronic Spinal Cord Injury. *J Neurosci*, 31, 9332–9344.
- Wegner, F.; Härtig, W.; Bringmann, A. G. J.; Wohlfarth, K.; Zuschratter, W. und Brückner, G. (2003): Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for

- glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol*, 184, 705–714.
- Weingarten, M. D.; Lockwood, A. H.; Hwo, S.-Y. und Kirschner, M. W. (1975): A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 1858–1862.
- Wilhelmsen, K. C.; Lynch, T.; Pavlou, E.; Higgins, M. und Nygaard, T. G. (1994): Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *Am J Hum Genet*, 55, 1159–1165.
- Witman, G. B.; Cleveland, D. W.; Weingarten, M. D. und Kirschner, M. W. (1976): Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 4070–4074.
- Wyss-Coray, T. und Mucke, L. (2002): Inflammation in Neurodegenerative Disease—A Double-Edged Sword. *Neuron*, 35, 419–432.
- Yamaguchi, Y. (1996): Brevican: a major proteoglycan in adult brain. *Perspect Dev Neurobiol*, 3, 307–317.
- Yamaguchi, Y. (2000): Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. REVIEW. *Cell Mol Life Sci*, 57, 276–289.
- Yasuhara, O.; Akiyama, H.; McGeer, E. G. und McGeer, P. L. (1994): Immunohistochemical localization of hyaluronic acid in rat and human brain. *Brain Res*, 635, 269–282.
- Yin, K.-J.; Cirrito, J. R.; Yan, P.; Hu, X.; Xiao, Q.; Pan, X.; Bateman, R.; Song, H.; Hsu, F.-F.; Turk, J.; Xu, J.; Hsu, C. Y.; Mills, J. C.; Holtzman, D. M. und Lee, J.-M. (2006): Matrix Metalloproteinases Expressed by Astrocytes Mediate Extracellular Amyloid-beta Peptide Catabolism. *J Neurosci*, 26, 10939–10948.
- Yuan, A.; Kumar, A.; Peterhoff, C.; Duff, K. und Nixon, R. A. (2008): Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci*, 28, 1682–1687.
- Zimmermann, D. R. und Dours-Zimmermann, M. T. (2008): Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. REVIEW. *Histochem Cell Biol*, 130, 635–653.
- Zimmermann, D. R.; Dours-Zimmermann, M. T.; Schubert, M.; Bruckner-Tuderman, L. und Heitz, P. U. (1994): Expression des extrazellulären Matrix-Proteoglykans Versican in humaner Haut. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 78, 481–484.

7 ANHANG

7.1 Ausgezählte Absolutwerte je P301L-Maus und Hirnregion

7.1.1 Maus P301L 287, 3 Monate

Tab. 7-1 Netz- und Tau- Nachweis (HAG & PT205)

	Region	Größe in μm^2	PN	je 1 mm^2	Neurone +TP ges.		PN +TP		Neurone +TP ohne PN	
					HP	NFTs	HP	NFTs	HP	NFTs
	PSC	1224945,92	150	122,45	92	0	2	0	90	0
	EC	543915,33	5	9,19	38	0	0	0	38	0
	Hipp	598964,94	15	25,04	132	0	0	0	132	0
	NR-m	284834,48	52	182,56	3	0	1	0	2	0
	SN-r	230626,09	73	316,53	0	0	0	0	0	0
	Mo5	311343,75	82	263,37	18	0	15	0	3	0
Summe		3194630,51	377	118,01	283	0	18	0	265	0
je 1 mm^2					88,59		5,63		82,95	

Tab. 7-2 Neuronenfärbung NeuN

	Region	Größe in μm^2	Neurone	je 1 mm^2
	PSC	1226679,07	2483	2024,16
	EC	576004,67	442	767,35
	Hipp	598200,97	1373	2295,21
	NR-m	285998,94	308	1076,93
	SN-r	230788,5	144	623,95
	Mo5	309852,34	109	351,78
Summe		3227524,49	4859	1505,49

7.1.2 Maus P301L P301, 3 Monate

Tab. 7-3 Netz- und Tau- Nachweis (HAG & PT205)

	Region	Größe in μm^2	PN	je 1 mm^2	Neurone +TP ges.		PN +TP		Neurone +TP ohne PN	
					HP	NFTs	HP	NFTs	HP	NFTs
	PSC	1475705,13	210	142,30	110	0	1	0	109	0
	EC	540865,73	0	0	126	0	0	0	126	0
	Hipp	414328,37	13	31,38	34	0	0	0	34	0
	NR-m	435574,11	151	346,67	3	0	1	0	2	0
	SN-r	225971,42	82	362,88	0	0	0	0	0	0
	Mo5	332400	115	345,97	7	0	7	0	0	0
Summe		3424844,76	571	166,72	280	0	9	0	271	0
je 1 mm^2					81,76		2,63		79,13	

Tab. 7-4 Neuronenfärbung NeuN

	Region	Größe in μm^2	Neurone	je 1 mm^2
	PSC	1462662,66	2908	1988,16
	EC	541794,28	662	1221,87
	Hipp	420511,7	1058	2515,98
	NR-m	439229,13	374	851,49
	SN-r	247926,4	128	516,28
	Mo5	337936,89	141	417,24
Summe		3450061,06	5271	1527,8

7.1.3 Maus P301L P302, 3 Monate

Tab 7-5 Netz- und Tau- Nachweis (HAG & PT205)

	Region	Größe in μm^2	PN	je 1 mm ²	Neurone +TP ges.		PN +TP		Neurone +TP ohne PN	
					HP	NFTs	HP	NFTs	HP	NFTs
	PSC	1507624,64	257	170,47	31	0	1	0	30	0
	EC	525222,88	0	0	28	0	0	0	28	0
	Hipp	440097,73	3	6,82	5	0	0	0	5	0
	NR-m	412286,55	162	392,93	9	0	8	0	1	0
	SN-r	227529,55	59	259,31	2	0	1	0	1	0
	Mo5	274168,1	102	372,03	4	0	4	0	0	0
Summe		3386929,45	583	172,13	79	0	14	0	65	0
je 1 mm²					23,33		4,13		19,19	

Tab. 7-6 Neuronenfärbung NeuN

	Region	Größe in μm^2	Neurone	je 1mm ²
	PSC	1492144,76	3288	2203,54
	EC	525152,42	781	1487,19
	Hipp	443422,64	911	2054,47
	NR-m	412691,48	364	882,01
	SN-r	229323,4	132	575,61
	Mo5	272512,5	91	333,93
Summe		3375247,2	5567	1649,36

7.1.4 Maus P301L P264, 8,5 Monate

Tab. 7-7 Netz- und Tau- Nachweis (HAG & PT205)

	Region	Größe in μm^2	PN	je 1 mm^2	Neurone +TP ges.		PN +TP		Neurone +TP ohne PN	
					HP	NFTs	HP	NFTs	HP	NFTs
	PSC	1216152,46	235	193,23	194	1	7	0	187	1
	EC	518730,66	0	0	52	2	0	0	52	2
	Hipp	415663,73	4	9,62	53	0	0	0	53	0
	NR-m	434609,31	124	285,31	14	7	13	6	1	1
	SN-r	243946,03	71	291,05	15	2	15	1	0	1
	Mo5	214928,98	66	307,08	7	1	7	1	0	0
Summe		3044031,17	500	164,26	335	13	42	8	293	5
je 1 mm^2					110,05	4,27	13,8	2,63	96,25	1,64

Tab. 7-8 Neuronenfärbung NeuN

	Region	Größe in μm^2	Neurone	je 1 mm^2
	PSC	1201130,86	2973	2475,17
	EC	523343,77	622	1188,51
	Hipp	415603,66	679	1633,77
	NR-m	430627,54	200	464,44
	SN-r	244791,21	97	396,26
	Mo5	199051,35	93	467,22
Summe		3014548,39	4664	1547,16

7.1.5 Maus P301L P265, 8,5 Monate

Tab. 7-9 Netz- und Tau- Nachweis (HAG & PT205)

	Region	Größe in μm^2	PN	je 1 mm^2	Neurone +TP ges.		PN +TP		Neurone +TP ohne PN	
					HP	NFTs	HP	NFTs	HP	NFTs
	PSC	1278113,62	219	171,35	122	2	18	0	104	2
	EC	512536,72	1	1,95	16	0	0	0	16	0
	Hipp	440013,58	4	9,09	43	0	2	0	41	0
	NR-m	418353,24	150	358,55	31	1	25	0	6	1
	SN-r	241926,65	55	227,34	4	0	3	0	1	0
	Mo5	198809,13	76	382,28	3	0	3	0	0	0
Summe		3089752,94	505	163,44	219	3	51	0	168	3
je 1 mm^2					70,88	0,97	16,51		54,37	0,97

Tab. 7-10 Neuronenfärbung NeuN

	Region	Größe in μm^2	Neurone	je 1 mm^2
	PSC	1274648,02	2929	2297,89
	EC	522987,81	629	1202,71
	Hipp	453405,3	734	1618,86
	NR-m	419703,94	396	943,52
	SN-r	241556,14	141	583,72
	Mo5	199067,44	93	467,18
Summe		3111368,65	4922	1581,94

7.1.6 Maus P301L P266, 8,5 Monate

Tab. 7-11 Netz- und Tau- Nachweis (HAG & PT205)

	Region	Größe in μm^2	PN	je 1 mm^2	Neurone +TP ges.		PN +TP		Neurone +TP ohne PN	
					HP	NFTs	HP	NFTs	HP	NFTs
	PSC	1207478,17	199	164,81	191	2	34	0	157	2
	EC	593574,81	0	0	33	6	0	0	33	6
	Hipp	414108,49	6	14,49	29	0	2	0	27	0
	NR-m	401507,81	109	271,48	15	12	5	5	10	7
	SN-r	209521,02	64	305,46	4	0	4	0	0	0
	Mo5	278628,13	118	423,50	7	9	5	7	2	2
Summe		3104818,43	496	159,75	279	29	50	12	229	17
je 1 mm^2					89,86	9,34	16,1	3,86	73,76	5,48

Tab. 7-12 Neuronenfärbung NeuN

	Region	Größe in μm^2	Neurone	je 1 mm^2
	PSC	1200303,42	2934	2444,38
	EC	595034,28	521	875,58
	Hipp	415804,35	818	1967,27
	NR-m	401496,69	333	829,4
	SN-r	213962,48	48	224,34
	Mo5	192680,05	102	529,38
Summe		3019281,27	4756	1575,21

7.2 Tabellen mit den errechneten Chancenverhältnissen und Logits je P301L-Maus und Hirnregion

Tab. 7-13 Chancenverhältnisse von Perineuronalen Netzen und Hyperphosphorylierungen

Maus	Alter	PSC	EC	Hipp	NR-m	SN-r	Mo5
287	3 Monate	0,34	0,51	0,18	2,48	0	1,84
P301		0,12	0	0,46	0,73	0	9,51
P302		0,39	0	11,73	10,4	1,23	3,02
P264	8,5 Monate	0,43	0	0,58	16,02	56,97	38,63
P265		2,25	7,53	16,31	7,96	4,92	7,24
P266		3,41	0	14,9	1,03	52,82	0,21

Tab. 7-14 Logistische Regression von Perineuronalen Netzen und Hyperphosphorylierungen

Maus	Alter	PSC	EC	Hipp	NR-m	SN-r	Mo5
287	3 Monate	-1,08	-0,67	-1,71	0,91	0	0,61
P301		-2,12	0	-0,78	-0,31	0	2,25
P302		-0,94	0	2,46	2,34	0,21	1,11
P264	8,5 Monate	-0,84	0	0	2,77	4,04	3,65
P265		0,81	2,02	2,79	2,07	1,59	1,98
P266		1,23	0	2,70	0,03	3,97	1,56

7.3 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck der Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Ort, Datum

.....

Sandra Schmutzler

7.4 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Arendt für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die Betreuung meiner Arbeit am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung der Medizinischen Fakultät Leipzig.

Mein ganz besonders Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Markus Morawski für die Einarbeitung sowie die engagierte und freundliche Betreuung während der gesamten Zeit. Probleme und Überlegungen trafen stets auf ein offenes Ohr und konnten gemeinsam besprochen und diskutiert werden.

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn PD Dr. Max Holzer für seine wertvolle Unterstützung und Hinweise sowie der Bereitstellung seiner Ergebnisse zu den motorischen Beeinträchtigungen der P301L-Mäuse (Rotarod-Versuch).

Herrn Dr. Carsten Jäger möchte ich ganz herzlich für die Einarbeitung in die Laborarbeit sowie die fachkundige und geduldige Beratung die Methoden betreffend danken. Er war mir ein wichtiger Ansprechpartner rund um den Laborbetrieb.

Herrn Prof. Gerd Brückner danke ich für Anregungen und Motivation während der Durchführung der Arbeit.

Des Weiteren gilt ein aufrichtiger Dank der gesamten Arbeitsgruppe „Molekulare und zelluläre Mechanismen der Neurodegeneration“ des Paul-Flechsig-Instituts für die freundliche und kollegiale Atmosphäre.

Meiner lieben Familie, insbesondere Jana Schmutzler, Franziska Franke und Stephan Thrum, danke ich für Korrekturen an meiner Arbeit. Weitaus wertvoller noch sind und waren mir aber die allzeitige Unterstützung und der feste Halt in jeder Lebenslage und während der gesamten Zeit meiner Ausbildung.